الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة منتوري قسنطينة

كلية العلوم الدقيقة — **قسم الكيمياء**

رقم الترتيب:.........

رقم التسلسل:.........

رسالة مقدمة لنيل شهادة الماجستير

في الكيمياء العضوية

شعبة كيمياء النبات

تحت عنوان:

إستخلاص، فصل و تحديد بنيات منتوج الأيض الثانوي عند نبات جنس *Centaurea*: *C.Sphaerocephala* L.

من طرف: باز مسعود

امام اللجنة:

الدكتورة فضيلة بن عياش	**أستاذة بجامعة منتوري قسنطينة**	**رئيسة**
الدكتور بن تامن علي	**أستاذ محاضر بجامعة منتوري قسنطينة**	**مشرف و مقرر**
الدكتور سمير بن عياش	**أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحن**
الدكتور عبد الرحمان ثنيو	**أستاذ بجامعة منتوري قسنطينة**	**ممتحن**

اكتوبر2006

إلى معلم الأجيال

إلى مربية الأجيال

إلى الوالدين الكريمين

أهدي هذا العمل

شكر و تقدير

الشكر و الحمد لله الذي خلق الإنسان من عدم، و علمه ما لم يكن يعلم، و الصلاة و السلام على أعلم الخلق النبي الأمي الأكرم.

و عملا بقول سيد الخلق: لم يشكر الله من لم يشكر الناس

أتقدم بالشكر الحار و التقدير و العرفان إلى الذي ساهم بجهوده و أفكاره العلمية من البداية و حتى النهاية، الأستاذ المشرف على هذا البحث:السيد **بن تامن علي**

كما أتوجه بخالص تشكراتي إلى ذات الحمل الثقيل و المسؤليات الكثيرة الأستاذة: **فضيلة بن عياش** لقبولها رئاسة لجنة المناقشة وعلى الجهود التي بذلتها خلال هذا البحث .

وأوجه خالص تشكراتي للأساتذة: **سمير بن عياش** و **عبد الرحمان ثنيو** لقبولهما عضوية هذه اللجنة.

كما لا أنسى تقديم شكري لكل أعضاء مخبر التحليل الفيزيوكيميائي و البيولوجي قسم الكيمياء، جامعة منتوري قسنطينة و كل من ساعدني قريبا كان أو بعيدا.

الفهرس

مقدمـــــــــة

يمثل الغطاء النباتي قسما كبيرا من الطبيعة المحيطة بنا و هو ذو أهميـــة كبيرة مـــن حيـــث أســـباب و ضروريات الحياة البشرية ، وقد امتدت يد الإنسان منذ القديم بالبحث و التنقيب عما في النبات مـــن أسرارغذائية،دوائية أو غيرها.

إن شساعة القطر الجزائري و موقعه الجغرافي و تعدد المناخات به (المناخ المتوسطي، المناخ القاري، المناخ شبه الصحراوي، المناخ الصحراوي) قد جعلته مكانا مناسبا لنمو العديد من الأنواع و الأصناف النباتية المختلفة وهذا ما دفع بالباحثين الجزائريين لدراستها و تحليلها كيميائيا.

بناءا على هذا و تكملة لما قام به الأساتذة الباحثون والطلبة بمخبر التحليل الفيزيوكيميائي و البيولوجي، قسم الكيمياء- جامعة منتوري قسنطينة، قمنا بدراسة فيتوكيميائية لإحدى نباتات الشـــرق الجزائـــري و هي *Centaurea sphaerocephala* L. المنتمية إلى العائـــلة المركبة التي تضم عددا كبيرا من الاجناس .

إن نبات جنس *Centaurea* كان هدفا للعديد من الدراسات الفيتوكيميائية التي أدت إلى فصل عدد كبيـــر من المركبات أهمها الفلافونويدات[2،1] و اللاكتونات السيسكوي تربينية[4،3].

تم اختيار هذه النبتة على أسس كيميائية و بيولوجية،فمن الناحيـــة الكيميائيـــة هـــو إحتـــواء جـــنس *Centaurea* على المركبات الفلافونويدية و تنوع كبير من اللاكتونات السيسكوي تربينيـــة، أمـــا مـــن الناحية البيولوجية فالكثير من الأنواع المنتمية لهذا الجنس أثبتت قدرتها العلاجية لكثير من الأمـــراض حيث تستعمل في الطب الشعبي.

يوجد بالقطر الجزائري45 نوعا من جنس *Centaurea* و قد أنجز على البعض منها العديد من الأبحاث و تم فصل عدد كبير من المركبات والجدول التالي يبين الأنواع التي تمت دراستها بمخبرنا:

النبتة	نوع و عدد المركبات المفصولة
Centaurea lippii	ثلاث فلافونويدات [5] لاكتونا سيسكوي تربيني[5]
Centaurea musimomum	أربعة عشرة لاكتونا سيسكوي تربيني[7،6]
Centaurea napifolia	خمسة فلافونويدات [9،8] لاكتونا سيسكوي تربيني[9،8]
Centaurea incana	أربعة عشرة فلافونويدا[10]
Centaurea calcitrapa	إثنا عشرة فلافونويدا [11] لاكتونين سيسكوي تربينين[12]
Centaurea pullata	لاكتونين سيسكوي تربينين[13]
Centaurea nicaensis	إثنا عشرة فلافونويدا [14] أربع لاكتونات سيسكوي تربينية[15]
Centaurea furfuracea	إثنا عشرة فلافونويدا[17،16]
Centaurea parviflora	أربع فلافونويدات[18]
Centaurea pungens	أربع فلافونويدات[19]
Centaurea granata	لاكتونا سيسكوي تربيني[20]
Centaurea maroccana	مركبين فلافونويديين [21] لاكتونين سيسكوي تربينين [21] مركبا عطريا[21]
Centaurea acaulis	فلافونويدا [8] ستة لاكتونات سيسكوي تربينية [21] مركبا عطريا[8]

الجدول رقم1: الانواع النباتية المدروسة و عدد و نوع المركبات المفصولة

و من بين أنواع *Centaurea* التي تمت دراستها بمخابر أخرى نذكر منها:
[22]*C. ruthenica*, [23] *C. ptosimopappa*, [24] *C.americana*, [25] *C. jacea*.

أما النبتة التي نحن بصدد دراستها فقد كانت محل بحث مرتين. [27،26]

و قد تم تقسيم هذه الرسالة إلى أربعة فصول و خاتمة:

الفصل الأول: و هو عبارة عن مدخل للفلافونويدات تعريفا، تصنيفا، تصنيعا و طرقا للفصل و التنقية.

الفصل الثاني: تم فيه الحديث عن الطرق الفيزيوكيميائية لتحديد الصيغ الكيميائية لمختلف المركبات الفلافونويدية.

الفصل الثالث: خص للطريقة العملية المخبرية المتبعة خلال هذا البحث من استخلاص، فصل....

الفصل الرابع: يتضمن النتائج المحصلة و مناقشتها.

و أخيرا الخاتمة: قــيمنا فــيها نتائج هذا البحث.

الفهرس

الفصـــــــــل I

الفـــلافـــونـــويـــدات

I.1.مفاهيم أساسية:

I.1.1. التعريف بالفلافونويدات:

تمثل المركبات الفينولية قسما بالغ الأهمية في حقل المنتجات الطبيعية وذلك لتعددها و تبـــاين هياكلهـــا البنائية، من هذه المركبات منتجات أيضية ثانوية تسمى:الفلافونويدات.
أصل تسمية الفلافونود يرجع إلى الكلمة الإغريقيـــة flavus التـــي تعنـــي اللـــون الأصـــفر، تنتشـــر الفلافونويدات في الأجزاء النباتية المختلفة، خاصة في الأوراق و البراعم و الأزهار، توجد في معظـــم الأصناف النباتية بالأخص الراقية منها، و منعدمة تقريبا عند الطحالب.[28،29،30]
هيكلها الأساسي بسيط نسبيا فهي تتكون من 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات من الشكل C_6-C_3-C_6: حلقتين عطريتين A و B تجمعهما حلقة غير متجانسة C. [31]

الشكل رقم1:الهيكل الفلافونويدي.

2.1.I. أقسام الفلافونويدات:

يمكن تقسيمها حسب جهة ارتباط الحلقة C إلى:

- فلافونويدات: إذا كان ارتباط الحلقة B مع الحلقة C انطلاقا من الكربون 2.

الشكل رقم2 : فلافونويد

- إيزو فلافونويدات : إذا كان ارتباط الحلقة B مع الحلقة C انطلاقا من الكربون 3.

الشكل رقم3 : إيزوفلافونويد

كما يمكن تقسيمها وفقا لدرجة تأكسد الحلقة C إلى الأقسام المبينة في الشكل رقم4 . [32]

FLAVONE FLAVONOL

وجود هيدروكسيل في الموضع3. وجود بروتون في الموضع3.

FLAVANONE DIHYDROFLAVONOL

غياب الرابطة الثنائية C_3-C_2 و وجود مركز لا تناظر.

CHALCONE FLAVAN-3,4-DIOL

هيدروكسيل في الموضع 4. غياب الحلقة C .

الشكل رقم4 :الهياكل الفلافونويدية المختلفة.

DIHYDROCHALCONE

FLAVAN-3OL

غياب وظيفة السيتون في الموضع4.

غياب الحلقة C و الرابطة الثنائيةC_3-C_2.

ANTHOCYNIDINE

ISOFLAVONE

إرتباط الحلقة B مع الحلقة C انطلاقا من الكربون3

AURONE

الحلقة C خماسية .

الشكل رقم4 :الهياكل الفلافونويدية المختلفة.(تابع)

2.I. الإصطناع الحيوي:

بينت التجارب التي أجريت باستعمال ^{14}C لمعرفة طرق الإصطناع الحيوي للفلافونويدات وجود طريقين:

- طريق الخلات
- طريق الشيكيميك

و الإنزيم الأساسي هو Chalcone synthase (CHS) [36،35،34،33]

1.2.I . طريق الخلات:

الحلقة A تتشكل من تكاثف رأس- ذيل لثلاث وحدات من الخلات على شكل Malonyl-CoA مع حمض Para-coumarique-CoA . الشكل رقم6 . [40،39،38،37]

2.2.I. طريق الشيكيميك:

أثبتت التجارب على عددا كبيرا من المركبات المختلفة أن لحمض الشيكيميك دور في تكوين الحلقةB .
إن تكاثف ثلاث وحدات من خلات الايثيل في صورة مالونات كوانزيم A يؤدي إلى تشكيل الحلقةA لتتحد مع حمض باراكوماريك،هذا التكاثف يؤدي إلى تكوين نواة الشالكون.الشكل رقم5 [43،42،41،40]
يعتبر 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone نقطة انطلاق لاصطناع العديد من الفلافونويدات بمساعدة إنزيمات تخص كل مرحلة.
ينتج الفلافانون من عملية تحوير فراغية نوعية ابتداءا من الشالكون[2]، كما أن إعادة الترتيب للفلافانون بمساعدة Iso flavone syntase تقود الى الإيزوفلافون، أماالإنزيم Flavanone Hydroxylase فيحفز تفاعل تثبيت الهيدروكسيل على الفلافانون لنحصل علىثنائي هيدروالفلافونول. [4،3]

الشكل رقم5 :طريق الشيكيميك

H_3C S-CoA + CO2 → OH S-CoA

Acethyl CoA ATP ADP Malonyl CoA

OH

CO_2H → S-CoA O

3x Malonyl CoA + S-CoA → HO OH OH OH O

الشكل رقم6 :طريق الخلات.

I.2.3. الإصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية بدءا من الشالكون:

بالوصول إلى مرحلة الشالكون تبدأ مرحلة تصنيع مختلف الهياكل اعتمادا على عدة إنزيمات.

CHALCONE

AURONE

FLAVANONE

ISOFLAVONE

DIHYDROFLAVONOL

FLAVONE

FLAVONOL

ANTHOCYANIDINE

FLAVAN-3OL

1-chalcone isomérase. . 2-flavanone -3hydroxylase. 3-isoflavone synthase
4-flavone synthase. 5-flavonol syntase 6- sans cataliseur.

الشكل رقم7 : الإصطناع الحيوي لمختلف الهياكل الفلافونويدية انطلاقا من الشالكون.

I.2.4. تثبيت المجموعات:

I.2.4.1. تثبيت مجموعات الهيدروكسيل:

يعتبر هيدروكسيلي الموقع 5 و الموقع 7 من المجموعات الأصلية في الحلقة A.[31]

بالنسبة للحلقة B فان هيدروكسيل الموقع 4´ يظهر قبل تكوين نواة الشالكون،[31] بينما هيدروكسيلي الموقع 3´ و الموقع 5´ فبعد غلق الحلقة C. [43،44]

وبالإمكان الإشارة أيضا إلى أن هيدروكسيل الموقع 3 يتم تثبيته في مرحلة تشكيل الشالكون.

1-قبل تشكيل نواة الشالكون. 2-بعد غلق الحلقة C.

3-في مرحلة تشكيل الشالكون. 4-قبل تشكيل النواة A.

الشكل رقم8 : تثبيت مجموعات الهيدروكسيل.

I.2.4.2. تثبيت مجموعات الميثيل:

- الحالة الأولى: تثبيت مجموعة الميثيل على الأجليكون حيث الرابطة بين كربون الميثيل و كربون الحلقتين A و B

- الحالة الثانية:هي مثيلة مجموعات الهيدروكسيل بوجود الإنزيم O-methyl-transférase، و يمكن تثبيت مجموعة الميثيل سواء قبل أو بعد تشكيل نواة الشالكون.[47،46]

كما يمكن ظهور مجموعات ميثوكسي عن طريق الميثلة المباشرة على الحلقة البنزينية.[32]

Centaflavone

الشكل رقم9 : تثبيت مجموعات الميثيل

I.3.4.2. تثبيت جزيئات السكر:

- الحالة الأولى:

تثبيت جزيئة السكر على الأجليكون حيث الرابطة بين كربون السكر و كربون الحلقتين A و B [40،36] (C-glucoside)، وهي مقاومة للأحماض و الإرتباط عادة بالموقعين 6 و 8.

- الحالة الثانية:

الرابطة من النوع O-glucoside و هذا بوجود الإنزيم O-glucoside-transférase.[40]

3-methoxy 7-O glucoside Chrysoeriol

Schaftosid

الشكل رقم10 : تثبيت جزيئات السكر

I.3.الإصطناع المخبري: [35]

نظريا توجد طريقتان أساسيتان لتصنيع الفلافونويدات مخبريا بشكل عام و هما :

-التكاثف الألدولي:

الشكل رقم11

-أسألة الفينولات:

الشكل رقم12

I.3.1.الشالكون:

يمكن الحصول على الشالكونات بالتكاثف الألـدولي لـــــ 2-hydroxyacetophenone مـــع المشـــتقات البنزينية الألديهيدية(benzenaldehydes) في الوسط الحمضي أو القاعدي.

في الوسط الحمضي تحدث عملية تحلق للشالكون تؤدي إلى ظهور الفلافانون وفـــق تفاعـــل متـــوازن (شالكون –فلافانون)، إلا أن هذا التوازن ينزاح بشكل شبه كلي إلى جهة الشالكون و هـــذا فـــي حالـــة وجود هيدروكسيل حر في الوضع4 بالنسبة للشالكون .

في الوسط القاعدي يجري التفاعل تحت الشروط التالية:

0°م-20°م ، KOH 50٪-60٪ ، 15 -48ساعة.

و قد لوحظ أن انعدام مجموعات الميثيل يؤدي إلي مردود جيد.

0°-5° NaH
8Jours

الشكل رقم13

و يمكن الحصول على الشالكونات ذات مجموعات الميثيل انطلاقا من الفلافانون و ذلك بفتح الحلقة في الوسط القاعدي الكحولي ثم الترسيب بالحمض الممدد و تحت حرارة منخفضة و للحصول على مردود جيد يلزم عدم وجود هيدروكسيل حر في الوضع5 بالنسبة للفلافانون.

I.2.3.ثنائي هيدروشالكون:

نتحصل على ثنائي هيدروشالكون من تكاثف الفينولات مع مشتقات حمض ثنـــائي هيـــدرو ســـيناميك (acide dihydrocinnamique) أو بهدرجة الشالكون أو الفلافانون.

OH OH
Zn
AcOH anhy
O O

الشكل رقم14

I.3.3.الفلافانون:

يتم الحصول على الفلافانون انطلاقا من الشالكون و هذا بغلق الحلقة و قد لوحظ أن وجود هيدروكسيل حر في الوضع '6 بالنسبة للشالكون يؤدي إلى مردود جيد و يمكن أن نـــذكر أيضـــا أن الفلافـــانون المستبدل في الوضع8 لا يمكن الحصول عليه إلا تحت شروط قاسية.

OMe OMe
OMe OMe
MeO OH MeO O
30 h Δ
MeO H_3PO_4 [ ] MeO
OMe O OMe O

الشكل رقم15

و فيما يلي بعض التفاعلات الخاصة التي يمكن الحصول بها على فلافانون خاص:

MeO OH OR2 OR1 OMe O

HBr/ AcOH

MeO O OR2 OR1 OMe O

R_1=Bz,R_2=Me
R_1=Me,R_2=Bz

R_1=H,R_2=Me
R_1=Me,R_2=H

الشكل رقم16

4.3.I.الفلافون:

OMe MeO OH OBz OMe O

$Br_2.CaCO_3$

OMe MeO OH BrHC CHBr OBz OMe O

OMe MeO OH MeO CH CHBr OBz OMe O

MeO MeO O OH OH O

الشكل رقم17

NBS
CCl_4

R_1=Ac, R_2=H
R_1=Me, R_2=OAc
R_1=Ac, R_2=OMe

R_1=R_2=H
R_1=Me, R_2=OH
R_1=H, R_2=OMe

1.I_2,AcOH
2.AcONa,AcOH anhy
3.MeONa

R_1=Sucre
R_2=Ac ou Me

R_1=Sucre
R_2=H ou Me

الشكل رقم18

I.3.5.الفلافونول:

H_2O_2
B^-

الشكل رقم19

و قد لوحظ أن شروط التفاعل ووجود المستبدلات لها تأثير كبير على المردودية، بالنسبة للمستبدلات فوجود هيدروكسيل في الوضع 2 و الوضع 4 ومجموعة ميثوكسيل في الوضع '6 يرفع من مردود التفاعل باتجاه الحصول على الفلافونول المطلوب.

أما الشروط المثالية فهي: H_2O_2 5 ٪ -30٪، NaOH 20٪

و يمنع تشكل الأورون في مثل هذه التفاعلات وجود مجموعة ميثوكسيل في الوضعα بالنسبة لوظيفة السيتون وتحت حرارة منخفضة و لمدة تتراوح بين 12-48 ساعة.

6.3.I. ثنائي هيدروالفلافونول:

H_2O_2[ ]

HCl[ ]

الشكل رقم20

و يمكن إجراء الخطوة الثانية من هذا التفاعل في وجود حمضHCl المركز أو باستعمال HCl النقي و حمض الخل البلوري و هذا بوجود BF_3 و الإثر كمذيب .

7.3.I.الأورون:

تقريبا كل الطرق العملية المستعملة تعتمد أساسا على تكاثف الكومارين مع الألديهيدات العطرية في وسط حمضي إلا أنه في حالة وجود سكريات كمستبدلات لا يمكن استعمال هذه الطريقة التي تتطلب وجود حمض HCl لذا نعتمد على تفاعلات أخرى:

الشكل رقم21

I.3.8.إيزوفلافون:

الشكل رقم22

الشكل رقم23

4.I. أهمية الفلافونويدات:

بينت الكثير من الدراسات و الأبحاث أن للفلافونويدات دورا مهما لعلاج الكثير من الأمراض[50،49،48] وقد لوحظ وجود ارتباط بين التركيبة الكيميائية للفلافونويد و خصائصه العلاجية، فوجود زيادة في مجاميع الهيدروكسيل ينتج عنه زيادة في النشاط المضاد للأورام[53،52،51]، و الزيادة في عدد مجاميع الميتوكسيل ينتج عنه الزيادة في النشاط المضاد للسرطان[56،55،54]. كما أن لبعض الفلافونويدات تأثيرات مضادة للالتهاب[58،57]، للحساسية[60،59]، للميكروبات[62،61] و للفيروسات [64،63].

طرق الفــصل والتنقية

I.5. الفصــل والتنقيــة:

I.5.1. الفصــل:

تستخدم الكروماتوغرافيا على نطاق واسع لفصل المركبات الفلافونويدية إذ تعتبر من أهم الطرق التحليلية و التحضيرية وهذا وفقا لمناهج هي:

I.5.1.1. كروماتوغرافيا العمود CC:

ويتم إجرائها كما يلي:

إختيار العمود ذي الأبعاد المناسبة وهذا حسب كمية المستخلص المستعمل ويثبت بواسطة حامل.

يعبأ العمود بالطور الثابت المشبع بالمذيب الأقل قطبية ويستخدم كطور ثابت عادة:

السليكاجال: لفصل الفلافونيدات الأجليكونية: 32غ لكل 1غ من المستخلص على الأقل

متعدد الأميد: لفصل الفلافونيدات الغليكوزيدية: 10غ لكل 1غ من المستخلص على الأقل

بعد توضع الطور الثابت بشكل جيد داخل العمود يحضر المستخلص وفق الطريقة المناسبة (صلب أو سائل) ثم يوضع على سطح الطور الثابت.

يضاف المملص الذي يكون في البداية غير قطبي ثم ترفع قطبيته تدريجيا إلى غاية الوصول إلى قطبية عالية، وتتم مراقبة الحزم بالاعتماد على الأشعة فوق البنفسجية (UV) حيث تستقبل أسفل العمود وهــذا في حالة استخدام متعدد الأميد كطور ثابت، أما في حالة استخدام السيلكاجال فيتم فحص وجمع الكسور بعد استقبالها أسفل العمود باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية.

I.5.1.2. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM:

تحضر طبقة رقيقة من دعامة صلبة على شريحة من الزجاج (20 سم× 20 سم) ثــم يوضــع الخليط عرضيا على بعد 1.5سم من خط الانطلاق ثم توضـــع الشــريحة فــي حــوض بــه المــذيب المناسب،وأثناء هجرته يجر معه مختلف المركبات على شكل حزم ويتم تحديدها بعد ملاحظتها

بالأشعة فوق البنفسجية (UV).

تكشط الحزم كلا على حدى وتوضع في قمع زجاجي وتغسل مرتين،الاولى بالمذيب المستعمل والثانية بالميثانول ، يركز الراشح وتفحص مدى نقاوة الحزم بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية، والأنظمة المستعملة كمذيبات عادة هي: [65]

بالنسبة لمتعدد الأميد:

الفلافونويدات الغليكوزيدية:

أستيل أسيتون:ميثيل إيثيل سيتون:الميثانول:الماء المقطر.

13 3 3 1

الفلافونويدات الأجليكونية قليلة الهيدروكسيل:

الميثانول: ميثيل إيثيل سيتون:الهكسان:الطولوين.   الميثانول: ميثيل إيثيل سيتون: الطولوين.

4 3 3   30 90 2 1.5

60 30 10 5

الميثانول: ميثيل إيثيل سيتون:الإثر:الطولوين.

60 2 10 10

الفلافونويدات الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل:

الماء المقطر:حمض الخل: الميثانول. حمض الخل:البيتانول العادي:الإيثانول: الماء المقطر.

50 25 20 2 18 1 1

بالنسبة للسيلكاجال:

الفلافونويدات الغليكوزيدية:

الميثانول: الماء المقطر:البيريدين:خلات الإيثيل.

80 20 10 5

الفلافونويدات الأجليكونية قليلة الهيدروكسيل:

الميثانول:الكلوروفورم.

15 1

3 1

الفلافونويدات الأجليكونية متعددة الهيدروكسيل:

الطولوين: أسيتون: الكلوروفورم.   الماء المقطر: الميثانول: خلات الإيثيل.

63 12 9   7 5 8

I.5.1.3. كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية CP :

يؤتى بورق من نوع **whatman** رقم I أو **III** ويوضع الخليط على كامل عرض الورقة على مسافة 2 سم من الحافة العلوية للورقة، وبعد أن تجفف تغمس في حوض به المذيب المناسب للفصل حيث تبدأ الحزم في الهبوط حتى وصول المذيب إلى مسافة قصيرة من الحافة السفلية للورقة.
تسحب الورقة من المذيب وتترك لتجف.
تحدد الحزم باستعمال الأشعة فوق البنفسجية(UV) وتقطع وتغمس في الميثانول ،فترشح ليجف الراشح، ثم تجرى له عملية فحص متعددة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للتأكد من نقاوة المركب، والأنظمة المستعملة في هذه التقنية عادة هي: [66]

الماء المقطر: حمض الخل: البيتانول العادي.
5 1 4
الماء المقطر: حمض الخل: البيتانول الثالثي.
1 3 1
حمض كلور الماء: الماء المقطر: حمض الخل.
30 10 3
الماء المقطر: حمض الخل. حمض الخل.
25 10 تراكيز مختلفة.
90 75

ويمكن استعمال كروماتوغرافيا الورقة التحضيرية ذات البعدين إذا كان البعد الواحد غير كاف لفصل الخليط فصلا كاملا على أن يكون البعدان عموديين، إذ بعد إجراء البعد الأول تسحب الورقة وتترك لتجف ثم تدار بزاوية 90^0 وتغمس في مذيب آخر وعادة يكون الأول عضويا والثاني مائيا.

I.5.1.4. كروماتوغرافيا السائل ذات الآداء العالي HPLC :

وتحتاج هذه التقنية لاستخدام ضغط عال لدفع المملص خلال عمود رفيع، وأفضل ما في هذه التقنية أن الفصل يتم بشكل جيد، وفي وقت قصير، والأنظمة المستعملة كمملصات عادة هي: [67]
حمض الخل:أستونتريل: الماء المقطر.
90 10 4
20 80 4

6.I. التنقية:

وتتم على:

عمود صغير من متعدد الأميد SC_6 باستعمال Toluène كمذيب وقليلا من الميثانول.

عمود صغير من Sephadex LH20 باستعمال الميثانول كمذيب .

كما يمكن الإعتماد على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية، و كذا على البلورة و إعادة البلورة.

الفصـــــــــل II

الدراسة البـــنيوية للفلافونويدات

تتركز على التقنيات التالية:

1. الخصائص الكروماتوغرافية:
- اللون الإستشعاعي
- ثابت الإحتباس
2. السبل الطيفية:
- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV).
- مطيافية الرنين النووي المغناطيسي
- مطيافية الكتلة
3. الإماهة الحمضية

II.1. الخصائص الكروماتوغرافية:

II.1.1. اللون الإستشعاعي:

إن أول ما يمكن إعتماده لمعرفة أو تحديد الصيغة البنيوية للفلافونيدات ولو بشكل عام هو لون المركب، تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV). الجدول رقم2

الصيغ المختلفة	**لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV)**
فلافون 5 ،6 ،7 ثلاثي هيدروكسيل فلافون 8،7،5 ثلاثي هيدروكسيل فلافون فلافونول مستبدل في الموضع3 بعض الشالكونات	بنفسجي-أسود
فلافون بدون هيدروكسيل في الموضع 5 فلافانون بدون هيدروكسيل في الموضع 5 فلافونول مستبدل في الموضع 3 أو بدون هيدروكسيل في الموضع 5	بنفسجي-نيلي
فلافونول مع هيدروكسيل حر في الموضع 3 ومع، أو بدون هيدروكسيل في الموضع5	أصفر أو أصفر باهت
فلافانون بدون هيدروكسيل في الموضع 5	أزرق مخضر
إيزوفلافون	برتقالي لامع
أورون بعض الشالكونات	أصفر مخضر أخضر

الجدول رقم2 : لون المركب تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV)
وعلاقته بالبنية الفلافونويدية.[68،67،66]

2.1.II. ثابت الإحتباس:

$$R_f = \frac{\text{ا لمسافة المقطوعة من طرف المركب}}{\text{المسافة المقطوعة من طرف المذيب}}$$

ونلجأ لثابت الإحتباس R_f لتحديد البنية المحتملة وهو قيمة مميزة لكل مركب في شروط كروماتوغرافية معينة من حرارة، رطوبة، تركيز للعينة، وللمذيب. ويمكن بهذا الثابت معرفة ما إذا

كان المركب جليكوزيدا أو أجليكونا، ومعرفة ما إذا كان المركب أحادي السكر أو ثنائي السكر أو ثلاثي السكر.[44،61]

مجموعات الهيدروكسيل الحرة قليلة ¬ R_f تزداد في النظام العضوي.
¬ R_f تنقص في النظام المائي.

إستبدال الهيدروكسيل بمجموعة ميثيل ¬ R_f تزداد في النظام العضوي.

المركب مستبدل بسكر أو أكثر ¬ R_f تزداد في النظام المائي. [70،69،68،67]
¬ R_f تنقص في النظام العضوي.

ولقياس ثابت الإحتباس R_f للمركبات النقية نستعمل عدة أنظمة ومنها:

الميثانول: ميثيل إيثيل سيتون: الطولوين.
3 3 4

أستيل أسيتون:ميثيل إيثيل سيتون:الميثانول:الماء المقطر.
1 3 3 13

2.II. السبل الطيفية:

1.2.II. مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV):

تعتبر هذه التقنية من أهم التقنيات لتحديد بنية الفلافونيدات وهذا لسهولة تحقيقها (لا تتطلب كمية كبيرة من المركب)، وأساس هذه التقنية هو أن لكل مركب طيف امتصاص مميز في الوسط الكحولي (الميثانول) ويتغير هذا الطيف بإزاحات معينة بعد إضافة الكواشف التالية:

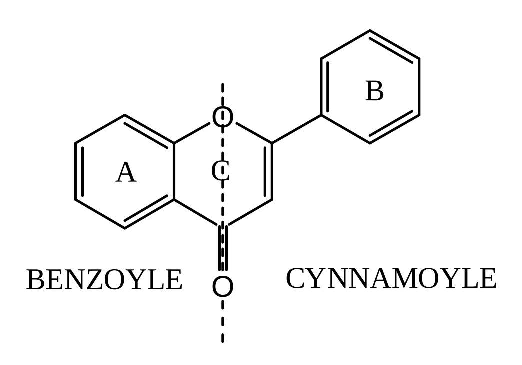
MeONa ou NaOH; $AlCl_3$, ($AlCl_3$+HCl); NaOAc,(NaOAc+H_3BO_3).

II.1.2.1. طيف الإمتصاص في الوسط الميثانولي:

يتميز طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV) في الوسط الميثانولي بوجود عصابتين:

العصابة I : في حدود (400, 300 nm) ناتجة عن إمتصاص الشكل الرنيني Cinamoyle وهذا لوجود ترافق مجموعة الكربونيل C_4 مع الرابطة الثنائية $C_2=C_3$ والحلقة العطرية B ويمكن من خلال هذه العصابة التمييز بين الفلافونول والفلافون .

العصابة II : في حدود (240-280 nm) ناتجة عن إمتصاص الشكل الرنينيBenzoyle (لوجود ترافق مجموعة الكربونيل C_4 مع الحلقة العطريةA).[71]



الشكل رقم24

ومن خلال المقارنات التي أجريت بين أطياف مختلف الفلافونيدات أمكن الوصول إلى عدة استنتاجات أهمها:

الزيادة في عدد مجموعات الهيدروكسيل الحرة يؤدي عادة إلى انزياح في اتجاه طول موجات أكبر (إنزياح باتروكومي) [72،73]

إستبدال مجموعة هيدروكسيل بمجموعة ميثيل أو سكر في المواقع 3، 5، 7، ′4 يؤدي إلى انزياح في اتجاه طول موجات أقل (إنزياح هيبسوكرومي). [73]

نوع الفلافونيد	العصابة I nm	العصابةII nm
فلافون	350-310	280-250
فلافونول هيدروكسيل الموضع3 مستبد ل	360-330	280-250
فلافونول هيدروكسيل الموضع3 حر	385-350	280-250
فلافانون وثنائي هيدروفلافونول	330-300	295-275
إيزوفلافون	330-310	275-245
شالكون	390-340	270-230 شدة منخفضة
أورون أنتوسيانيدين وأنتوسيانين	430-380 560-465	270-230 280-270

الجدول رقم3 :أهم الإنزياحات الملاحظة في الوسط الميثانولي.

2.1.2.II. طيف الإمتصاص في وجود NaOH أو NaOMe:

هيدروكسيل الصوديوم قاعدة قوية تؤين جميع مجموعات الهيدروكسيل للمركب الفلافونيدي (إنزياح باتوكرومي لكامل الطيف)، ويكون تأثيرها على العصابة I أشد منه على العصابةII .[67]

3.1.2.II. طيف الإمتصاص في وجود NaOAc:

خلات الصوديوم قاعدة ضعيفة لذا فهي تؤين مجموعات الهيدروكسيل الأكثر حامضية فقط C_3،C_4،C_7 وتعتبر كاشفا نوعيا لهيدروكسيل الموقع 7، ويظهر ذلك جليا على العصابةII للطيف المسجل. [45]

II.2.1.4. طيف الامتصاص في وجود $NaOAc+H_3BO_3$:

يستخدم هذا المحلول للكشف عن أورثو ثنائي الهيدروكسيل، إذ يشكل حمض البوريك معقدات معها في وجود الخلات ويؤدي إلى انزياح باتوكرومي. [74]

الشكل رقم25

II.2.1.5. طيف الإمتصاص في وجود $AlCl_3+HCl$ و $AlCl_3$:

يشكل $AlCl_3$ مع الكربونيل C_4 وهيدروكسيل الموقع C_3 أو الموقع C_5 معقدات وكذلك مع أورثو ثنائي الهيدروكسيل، إلا أن الأول معقد ثابت والثاني غير مستقر في الوسط الحمضي.

التحليل يبدأ أولا بمقارنة الطيف المسجل في الميثانول مع الطيف المسجل في ($AlCl_3+HCl$) وفي حالة وجو د انزياح باتوكرومي للعصابة I يدل على وجود هيدروكسيل في الموقع5 أو 3.

في المرحلة الثانية تتم مقارنة الطيف المسجل في وجود ($AlCl_3+HCl$) مع الطيف المسجل في وجـــود $AlCl_3$ ففي حالة وجود انزياح هيبسوكرومي للعصابة I بعد إضافة HCl إلى طيــف $AlCl_3$ دل علـــى وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقة A أوB. [70] الشكل رقم26

الشكل رقم26

المفاعل	الإزاحة nm		التعليل
	العصابة I	العصابة II	
MeOH	350-310 360-330 375-350 330-300	280-250 280-250 280-250 295-275	فلافون فلافونول (3-OR) فلافونول (3-OH) فلافانون
NaOMe	+45 إلى +65 مع استقرار الشدة الضوئية +45 إلى 65 مع نقصان في الشدة الضوئية +45 إلى 65 طيف يتحلل مع الوقت عصابة جديدة بين 330nm -320		4′-OH 3-OH،4′-OR 4′-OH،3-OH أو أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقـــة A أو الحلقة B 7-OH
NaOAc		+5 إلى +20 عدم وجود انزياح أو انزياح ضعيف طيف يتحلل مع الوقت	7-OH 7-OH مع مستبدل في 6 أو 8 5، 6، 7- 5، 7، 8- 3، 3′ ،4′ ثلاثي هيدروكسيل
H_3BO_3+ NaOAc	+12 إلى +36 إزاحة باتوكرومية ضعيفة		أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A

الجدول رقم4 : التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية(UV) .

AlCl$_3$	+30 إلى +36 مقارنة بطيف AlCl$_3$/HCl +20 إلى +40 مقارنة بطيف AlCl$_3$/HCl		أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة B أورثو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة Aو الحلقة Bكذلك
AlCl$_3$+ HCl	17 إلى +55 +35 إلى +55 +50 إلى +60		5-OH مع مجموعة أوكسجينية في الموقع 6 5-OH 3-OH أو 3-OH و5-OH

الجدول رقم4 : التأثيرات المختلفة للكواشف على طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV) (تابع).

2.2.II. مطيافية الرنين النووي المغناطيسيRMN :

يعتبر طيف الرنين النووي المغناطيسيRMN من أهم الطرق المتاحة للحصول على التركيبة الكيميائية للمركبات وتوجد عدة تقنيات هي:

- طيف RMN للبروتون ^{1}H
- طيف RMN للكربون ^{13}C

كما ظهرت للوجود تقنيات جديدة أمكن بها الجمع بين أطياف البروتون ^{1}H والكربون ^{13}C للحصول على طيف ثنائي البعد، ويمكن بهذه التقنيات معرفة:

- درجة تأكسد الحلقات A, B, C
- عدد مجموعات الميتوكسيل
- عدد السكريات ونوع الرابطة α اوβ .

وفيما يلي جداول تبين بعض الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقاتA,B,C . [72،75]

(H-8) δ, ppm	J, Hz	(H-6) δ, ppm	J, Hz	(H-5) δ, ppm	J, Hz	الفلافونيد
6.3-6.5 (d)	2.5	6.0-6.2 (d)	2.5	—		5,7-OH
6.5-6.9 (d)	2.5	6.2-6.4 (d)	2.5	—		5-OH, 7-O sucre
6.7-7.0 (d)	9.0-2.5	6.7-7.1 (dd)	9.0-2.5	8.0 (d)		7-OR (H, sucre)
6.3 (s)		—		9.0		5,6,7-OR(H,sucre)
—		6.3 (s)		—		5, 7, 8-OR
				—		

الجدول رقم5 : الإنزياحات الكيميائية لبروتونات الحلقة A [72]

H-2′, δ,ppm	H-6' J, Hz	H-5′ , δ, ppm	H-3′ J, Hz	الفلافونيد
6.5-7.1 (d)	8.5	7.7-7.9 (d)	8.5	4'-OR فلافون
6.5-7.1 (d)	8.5	7.9-8.1 (d)	8.5	4'-OR فلافونول

الجدول رقم 5 : الإنزياحات الكيميائية لبروتينات الحلقةB

بالنسبة لبروتون الحلقة C في الفلافون ذو إشارة أحادية في المجال (6.2-6.4 ppm).

بروتونات الميتوكسيل تتموضع في المجال (3.5-4.1 ppm). [76]

بروتونات السكر تتميز بالبروتون الأنوميري، إذ يختلف انزياح هذا البروتون حسب طبيعة الفلافونيد وكذا موقع ونوع الرابطة بين السكر والأجليكون وتتواجد إشارته عموما في مجالات أدنى من مجال إشارات بقية بروتونات الاجليكون.[70] الجدول رقم7

H-1"(δ, ppm)	طبيعة السكر
5.25-5.56	3-O-β-D-Glucoside
5.6	3-O-β-D-Galactoside
4.64-4.88	8-C-β-D-Glucoside
4.85-5.26	6-C-β-D-Rhamnoside

الجدول رقم7 :قيم الإنزياح للبروتون الأنوميري لبعض الجليكوزيدات فيDMSO-d6

II.2.3. مطيافية الكتلة:

وتستعمل هذه التقنية للتعرف على البنية الكيميائية للمركب بمعرفة الوزن الجزيئي، وبدراسة مختلف الشظايا الناتجة عن انقسامه. ومن التقنيات المستعملة:

II.2.3.1. تقنية القذف الإلكترونيEI:

وتتم هذه التقنية بقذف المركب بسيل من الإلكترونات داخل غرفة التأين عند درجة الحرارة المناسبة. $M+1e^{-} \rightarrow M^{+}+2\,e^{-}$

إلا أن هذه التقنية غير صالحة مع الجليكوزيدات لاحتوائها على المستبدلات السكرية وفيما يلي شرح لأهم الشظايا على بعض الأقسام الفلافونويدية بشكل عام:

الشكل رقم27: آليات الإنشطار لبعض الفلافونويدات.

$B_1^{\bullet+}$ B_2^{+}

FLAVONE

$[A_1+H]^{+}$ $A_1^{\bullet+}$

$A_1^{\bullet+}$ ISOFLAVONE $B_1^{\bullet+}$

الشكل رقم27: آليات الإنشطار لبعض الفلافونويدات. (تابع)

الشكل رقم27: آليات الإنشطار لبعض الفلافونويدات. (تابع)

II.2.3.2. تقنية القذف السريع بالذرات F.A.B : [77]

تستعمل هذه التقنية مع المركبات الجليكوزيدية، حيث يتم تأين المركبات دون تسخين ومن مميزات هذه التقنية:

- تكوين أيونات موجبة وسالبة.
- مدة حياة طويلة للعينة.
- تكوين أيونات شبه جزيئية.Quasi moléculaires

II.3.3.2. تقنية الإلكتروسبراي:

تسمح بدراسة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة كالبروتينات وتستعمل أيضا مع الجليكوزيدات (O-glycosides)

II.3. الإماهة الحمضية:

ويتم الاعتماد على هذه العملية لمعرفة عدد ونوع السكريات وشكل الإرتباط مع الجليكوزيدات.
عمليا يتم أخذ كمية من الجليكوزيد المذاب في أقل كمية من الميثانول، يضاف له 2 مل من محلول (4N,HCl)، ويسخن الخليط في حمام مائي تحت 100°م من 15 إلى 120 دقيقة.
بعد هذا تضاف 2 مل من الإثرالإثيلي EtOEt و يرج جيدا ثم تفصل الطبقة العضوية، وتكرر العملية مع خلات الإيثيل AcOEt ، وأخيرا مع البيوتانول العادي n-Butanol.
تركز كل الطبقات العضوية والمائية وبهذا نحصل علىالأجليكون في إحدى الطبقات العضوية والجزء السكري في الطبقة المائية.
وأخيرا يتم التعرف على الأجليكون المنفصل بتسجيل طيف الأشعة فوق البنفسجية(UV) أما الجزء السكري فيتم في البداية تحضير شرائح كروماتوغرافية ترش بمحلول (0.2 M NaH_2 PO_4)
ثم تترك لتجف لتوضع بعدها بقع من الطبقة المائية وبعض الشواهد السكرية المعروفة وتغمس الشريحة في المذيب أسيتون/ماء (1/9)

بعد انقضاء الوقت المناسب وسحب الشريحة وجفافها، ترش بمحلول مالونات الأنيلين (1غ حمض المالونيك- 1 سم^3 أنيلين -3 سم^3 حمض الفوسفوريك- الإيثانول 80 ٪-100سم^3) ثم تسخن تحت 100°م لمدة 5 دقائق لتظهر بقع السكر على الشريحة وبهذا يتم معرفة نوع السكر.

السكر	R_f
α(L)rhamnose	0.88
D(+)xylose	0.79
β(+)glucose	0.53

.

الجدول رقم8: قيم ثابت الإحتباس R_f لبعض السكريات المعروفة

الفصـــلIII

طــريــقـــــــــة الفــصـــــــــــــــل

III. النتائج الكيميائية :

1.III. الدراسة النباتية لــ **L. *C. sphaerocephala* :**

1.1.III وضع النبتة ضمن التصنيف النظامي للنباتات:

الفرع	Angiospermes	Embranchement
الصنف	Dictotyledones	Classe
الرتبة	Asterales	Ordre
العائلة	Composées	Famille
تحت العائلة	Tubiflores	Sous-Famille
القبيلة (الفصيلة)	Cynarées	Tribu
الجنس	Centaurea	Genre
النوع	*sphaerocephala*	Espece

2.1.III. وصف النوع ***sphaerocephala*** :

كما هو الحال لمعظم النباتات الزهرية فإن نبات .L *C. sphaerocephala* هو نبات معمر، ذو سـيقان متفرعة، غير قائمة في الغالب(أرضية) طولها من 10 إلى 70 سم أوراقها الفتية لزجة و مدببة .
في نهاية الساق زهرة وحيدة بنفسجية مغلفة بحراشف مجتمعة على شكل كرة، طول كل حرشـفة مـن 10 إلى 30 مم، و لكل حرشفة من 5 إلى 13 شوكة غير متداخلة و منظمة تتجه من قلب الزهرة إلـى خارجها.

III.2. المادة النباتية :

تم جمع هذه النبتة في شهر جوان من سنة 2003 من منطقة القالة ولاية الطارف بالشرق الجزائري. حيث تم قطفها ثم تقسيمها إلى أعضائها المختلفة (الأوراق والأزهار). أجريت عملية التجفيف لهذه الأعضاء بوضعها في أماكن خاصة تحت الظل وبعيدا عن الرطوبة، حيث تم الإستخلاص كل على حدى ثم الجمع بين مستخلصيهما لاحتوائهما على نفس المركبات وكانت كتلة المادة المستعملة هي 2.170 كغ من الأوراق والأزهار

III.3. التحليل الكيميائي :

III.3.1. الإستخلاص :

تمت عملية الاستخلاص كما يلي:

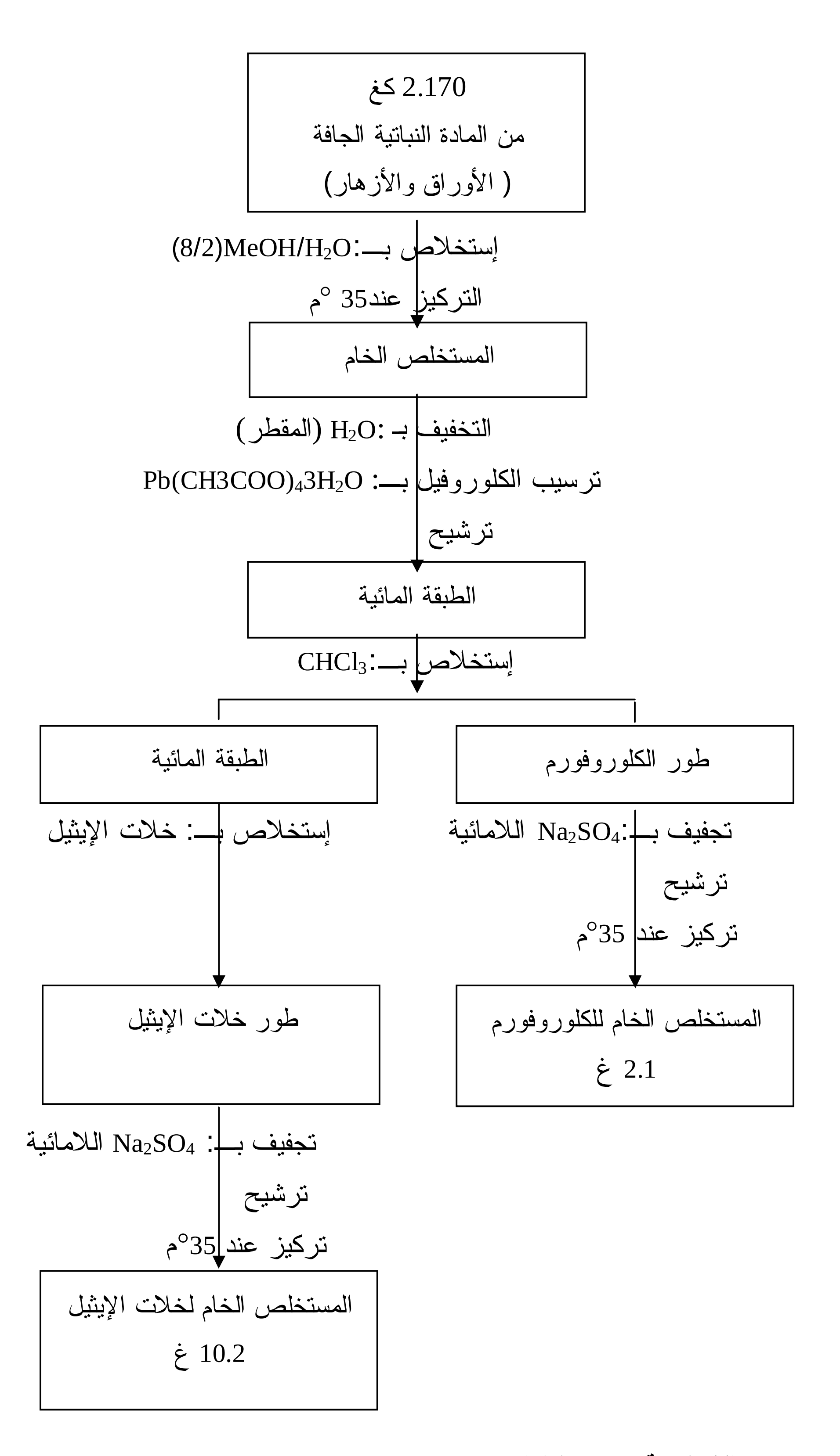
بعد تجفيف الأوراق والأزهار و تنقيتها و تقطيعها نقعت في خليط من الميثانول و الماء(2:8) وتركت لمدة 24 ساعة، رشح و ركز المحلول تحت ضغط منخفض و35 درجة مئوية. أعيدت هذه العملية ثلاث مرات.

يخفف المحلول الناتج بالماء المقطر ثم يضاف رباعي خلات الرصاص للتخلص من الكلوروفيل، يرشح الخليط و يستقبل الراشح في دورق لتبدأ عملية الإستخلاص من النوع سائل-سائل كما يلي:

1) يضاف الكلوروفورم للراشح،على أن يكون الحجم المستعمل مساويا لثلث حجم الراشح تفصل الطبقة العضوية وتركز.تعاد العملية ثلاث مرات، يجفف المحلول الكلوروفورمي بكبريتات الصوديوم اللامائية Na_2SO_4، يرشح المحلول و يركز الراشح. (تحصلنا على2.1غ)

2) الطبقة المائية أعيد استخلاصها مرة أخرى بخلات الإيثيل بنفس طريقة الكلوروفورم (تحصلنا على10.2غ)

ويمكن تلخيص هذه العملية في الشكل التالي:



الشكل رقم28 :عملية استخلاص *C. sphaerocephala* L.

III.2.3. الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود :

أخذنا مستخلص خلات الإيثيل (9,5 g) وأجرينا عليه عدة اختبارات لأجل اختيار المملص والدعامة بعد ذلك عالجناه بواسطة كروماتوغرافيا العمود حيث كانت الدعامة هي :

gel de silice 60, 0,04-0,06 3 mm (230-400 mesh) ASTM merk وكان طول العمود 80 سم وقطره 4 سم طول الدعامة 60 سم والمملص المستعمل هو الكلوروفورم ثم زيادة الأسيتون تدريجيا والكسور المحصل عليها جمعت تبعا لكروماتوغرافيتها على الطبقة الرقيقة التحليلية بعد معالجة هذه الأخيرة بواسطة الكاشف (Révelateur) الذي هو عبارة عن خليط مكون من CH_3COOH (80 ml) H_2O(16ml) H_2SO_4 (4 ml) ، وتسخينها داخل فرن درجة حرارته100 م° لمدة ثلاثة دقائق بعد فحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) 254 و 366 نانومتر.

الكسور	المملص	الوزن (مع)	ملاحظات
300مل (F_1)	$CHCl_3$ 100 %	30	شحوم
800مل (F_2)	$CHCl_3$ -Acetone 19-1	290	شحوم زائد كلوروفيل
1 -8 (F_3)	$CHCl_3$ -Acetone 15-1	82	خليط معقد
9 – 16 (F_4)	$CHCl_3$ -Acetone 12-1	73	خليط معقد
17 -26 (F_5)	$CHCl_3$ -Acetone 9-1	31	خليط
27 –96 (F_6)	$CHCl_3$ -Acetone 9 -1	756	بقعتان
97 -116 (F_7)	$CHCl_3$ -Acetone 7 -1	86	خليط
117 -148 (F_8)	$CHCl_3$ -Acetone 5 -1	490	خليط
149 -188 (F_9)	$CHCl_3$ -Acetone 3 -1	165	خليط
189 -208 (F_{10})	$CHCl_3$ -Acetone 1 -1	362	خليط قابل للفصل
209 -240 (F_{11})	$CHCl_3$ -Acetone 1 -1	268	خليط
241 -279 (F_{12})	$CHCl_3$ -Acetone 1 – 2	1402	خليط قابل للفصل

جدول رقم9: كروماتوغرافيا العمود لمستخلص خلات الإيثيل *C. sphaerocephala* L.

280-299 (F_{13})	$CHCl_3$ -Acetone 1 – 3	1120	خليط قابل للفصل
300 -307 (F_{14})	$CHCl_3$ -Acetone 1 – 3	392	خليط قابل للفصل
308 -340 (F_{15})	$CHCl_3$ -Acetone 1 – 5	890	خليط قابل للفصل
1000مل (F_{16})	Acetone 100 %	1306	خليط معقد
1000مل (F_{17})	MeOH 100 %	1410	خليط معقد

جدول رقم9: كروماتوغرافيا العمود لمستخلص خلات الإيثيل *C. sphaerocephala* L. (تابع)

III.3.3. الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة:

III.3.3.1. معالجة الكسر F_6(762مغ):

بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية المكررة مرتين باستعمال شرائح من السيليكلجال تم فصل مركبين هما: CSF_{62}(6مغ)، CSF_{61}(5مغ) حيث كان المذيب هو $CHCl_3$:CH_3OH 15:1

باستعمال الأشعة فوق البنفسجية (UV) 254،366 نانومتر

تمت تنقية المركب CSF_{61} باستعمال شرائح من السيليكلجال حيث كان المذيب هو:

$CHCl_3$:CH_3OH 12:1

III.3.3.2. معالجة الكسر F_{10}(362مغ):

بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية المكررة مرتين باستعمال شرائح من متعدد الاميد تم فصل مركبين هما: CSF_{102} (16مغ)، CSF_{101} (10مغ) حيث كان المذيب هو:

الطولوين:الميثانول: ميثيل إيثيل سيتون 3:3:4

باستعمال الأشعة فوق البنفسجية(UV) 254،366 نانومتر

تمت تنقية المركبين CSF_{101} ،CSF_{102} باستعمال شرائح من السيليكلجال حيث كان المذيب هو:

$CHCl_3$:CH_3OH 9:1

الفصـــلIV
تشخيـــــص المركبـــــــات المفصولـــــــة

IV. تشخيص المركبات المفصولة:

النظامI: الميثانول: ميثيل إيثيل سيتون: الطولوين.
3 3 4

النظامII: أستيل أسيتون:ميثيل إيثيل سيتون:الميثانول:الماء المقطر.
1 3 3 13

2.IV. تشخيص المركب CSF_{61} :

خواصه الكروماتوغرافية:

جدول رقم9 : الخواص الكروماتوغرافية للمركب CSF_{61}

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.74	0.01
اللون الإستشعاعي	بنفسجي	

جدول رقم10: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV)

للمركب CSF_{61} (الطيف رقم1: طول الموجة بالنانومتر)

المفاعلات	الحزمة II	الحزمة I
MeOH	272	340
NaOH	348-272	404
NaOAc	276	348
H_3BO_3 + NaOAc	276	340
$AlCl_3$	276	364
$AlCl_3$+HCl	276	364

التحليل:

اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) و الحزمة I في حدود 340 نم بالنسبة للطيف المسجل في MeOH دلالة على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الوضع3

قيم ثابت الاحتباس(R_f) تدل على أن المركب هو اجليكون .

بمقارنة الطيف المسجل في NaOH بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باثوكرومية للحزمةI (+64 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع4'، كما نلاحظ ظهور حزمة جديدة في حدود 348نم دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع7.

بمقارنة الطيف المسجل في $AlCl_3$ بالطيف المسجل في ($AlCl_3$+HCl) لا نجد أي إزاحة دلالة على عدم وجود أي أورثو ثنائي هيدروكسيل .

بمقارنة الطيف المسجل في($AlCl_3$+HCl) بالطيف المسجل فيMeOH نجد إزاحة باثوكرومية للحزمةI (+24 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع5.

الطيف المسجل في NaOAc يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الوضع7 و هذا اعتمادا على الإزاحة الباثوكرومية للحزمةII (+4 نم) و التي تشير أيضا إلى عدم وجود مستبدل في الوضع6 و الوضع8 و بما أن الطيف لا يتحلل مع الوقت فإنه لا وجود لثلاثي هيدروكسيل و لا وجود لأورتو ثنائي الهيدروكسيل أيضا على الحلقة A .

الطيف المسجل في (H_3BO_3 + NaOAc) يشير إلى عدم وجود أورتو ثنائي الهيدروكسيل علىالحلقةA والحلقةB وهي نفس الملاحظات المأخوذة من الطيف المسجل في ($AlCl_3$+HCl)

مجموعة هذه المعلومات تقود إلى الصيغة التالية:

جدول رقم11 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتونRMN-^{1}H

(الطيف رقم3)   CSF$_{61}$ للمركب (CDCl$_3$+CD$_3$OD,250MHz)

التعيينات الكيميائية	***J*(Hz) ثابت الإقتران**	**التكامل**	**التعددية**	**الإزاحة (ppm)**d
H_6	2.29	1H	d	6.20
H_8	2.29	1H	d	6.29
H_3	—	1H	s	6.55
$H_{5'}$	8.43	1H	d	6.80
$H_{2'}$,$H_{6'}$	—	2H	m	7.40
-OCH_3	—	3H	s	3.85

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H (الطيف رقم3) الذي دونت نتائجه في الجدول رقم11 وجود إشارتين ثنائيتين (J=2.29) بتكامل 1H لكل منهما عند δ=6.20 وδ=6.29 وهي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقةA لذا يمكن نسبتهما إلى كل من H_6 وH_8 على الترتيب وذلك تأكيدا لما ورد في نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV).

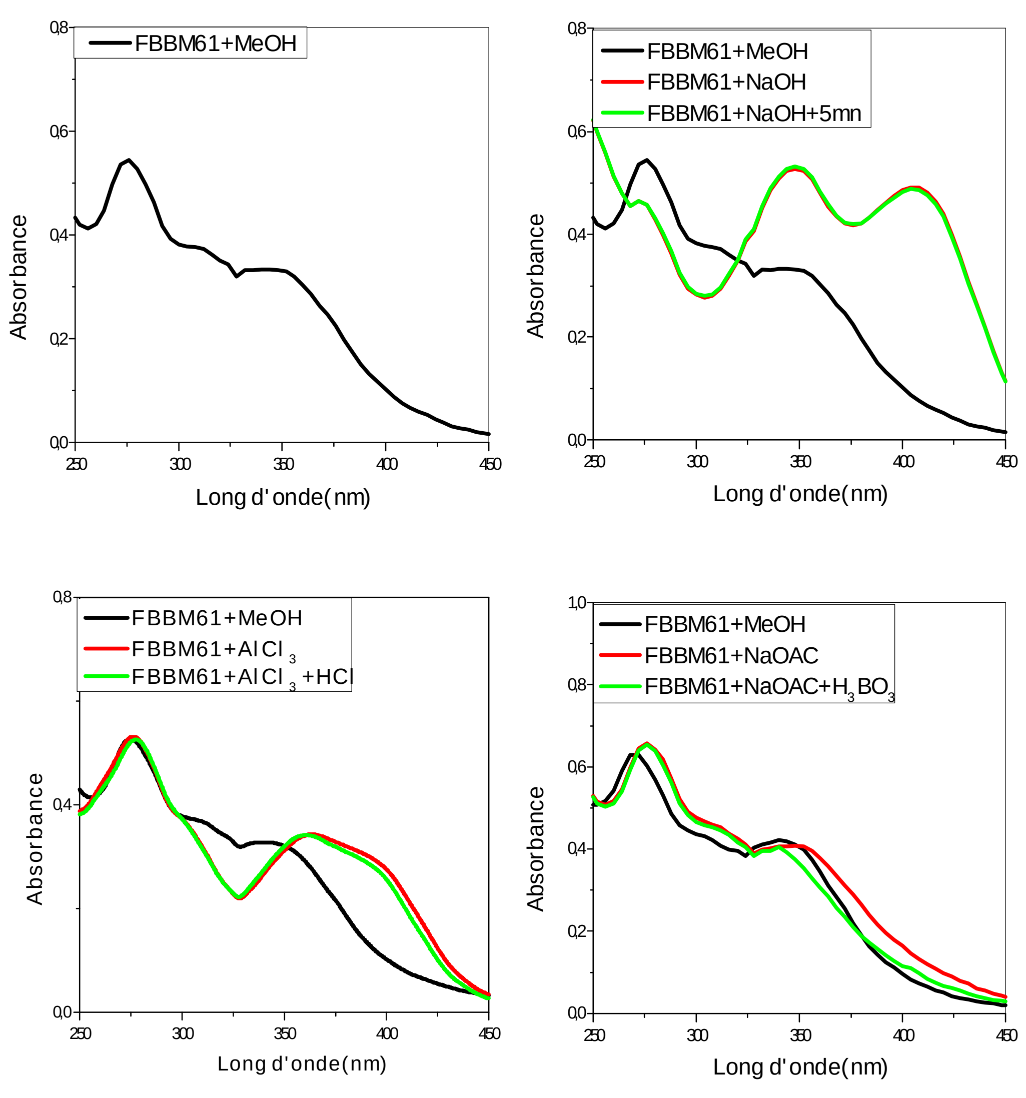
كما يبين نفس الطيف وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند δ=6.55 يمكن نسبتها إلى البروتون H_3 وهذا تأكيدا لما ذكر من خواصه الكروماتوغرافية.

و نشير أيضا إلى وجود إشارة ثنائية (J=8.43) بتكامل 1H عند δ=6.80 يمكن نسبتها إلى البروتون $H_{5'}$
و نلاحظ وجود إشارات متعددة بتكامل 2H بجوار δ=7.40 يمكن نسبتها إلى البروتونين $H_{6'}$ و $H_{2'}$.

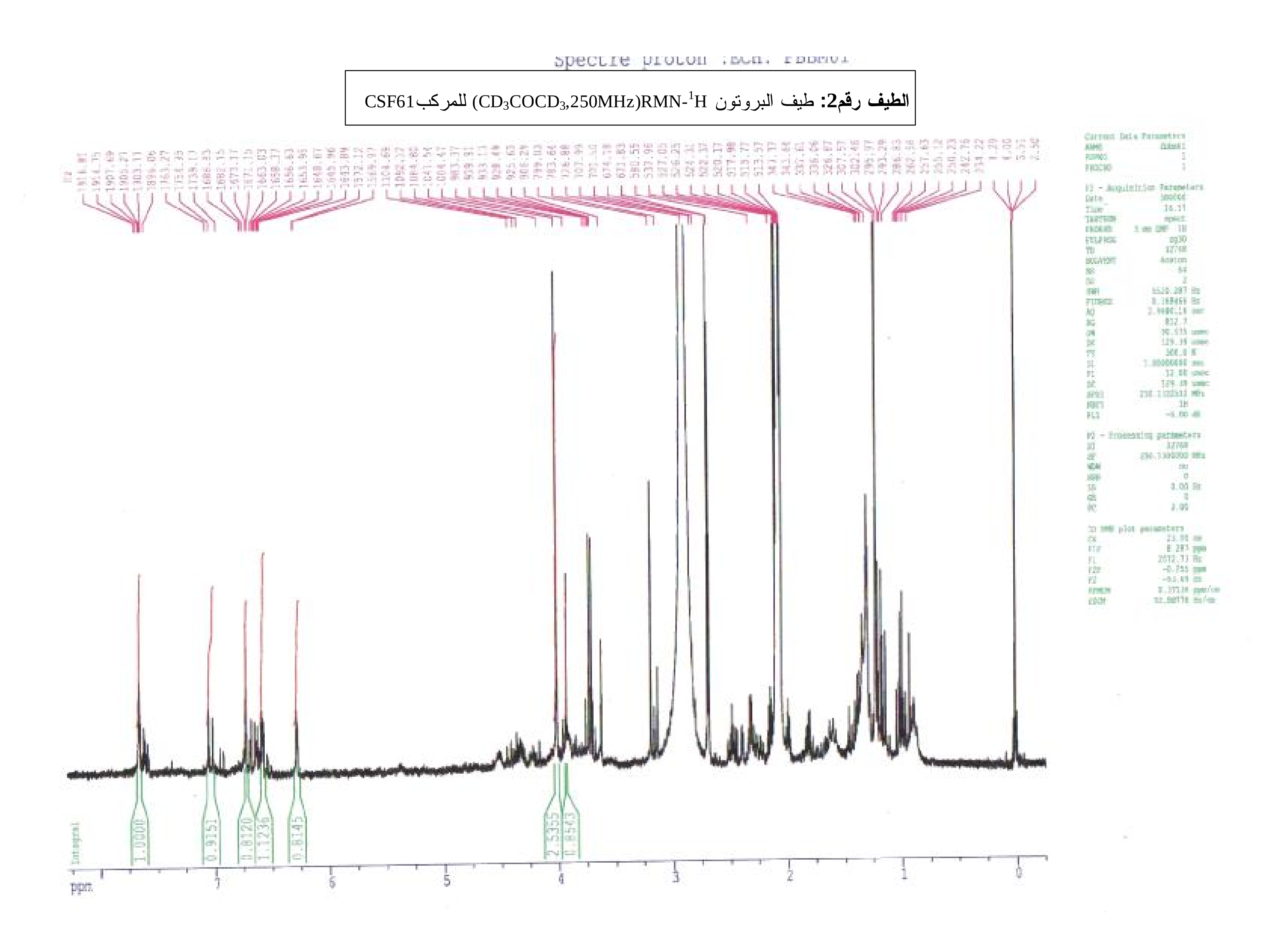
اما الإشارة الأحادية ذات التكامل 3H عند δ=3.85 فهي خاصة بمجموعة ميثوكسيل في الوضع'3
وهذا إعتمادا على النتائج السابقة.

مجموعة هذه المعلومات تقود إلى الصيغة التالية :

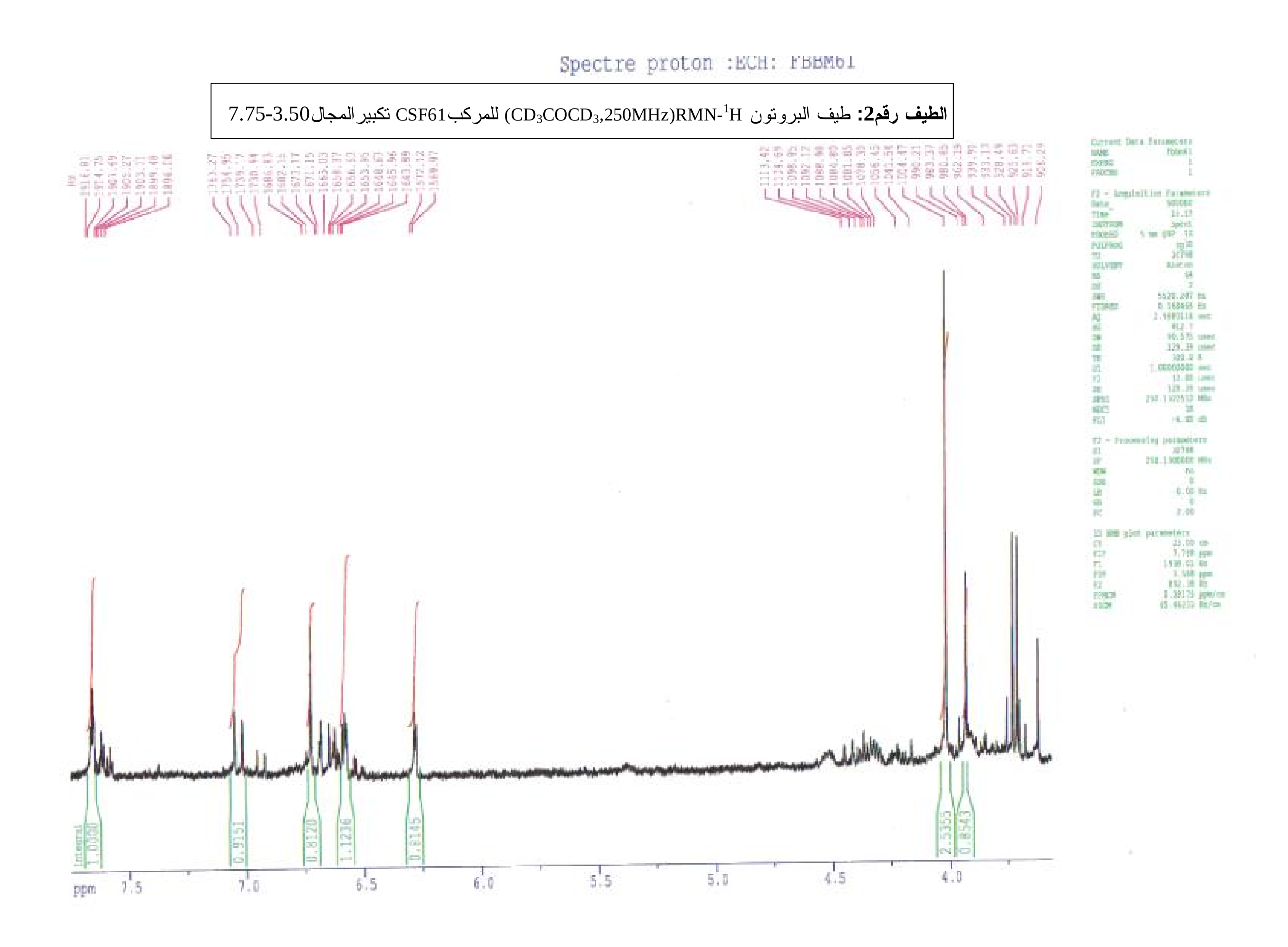
5,7,4'-trihydroxy 3'-methoxyflavone (3'-methoxy apigénine).



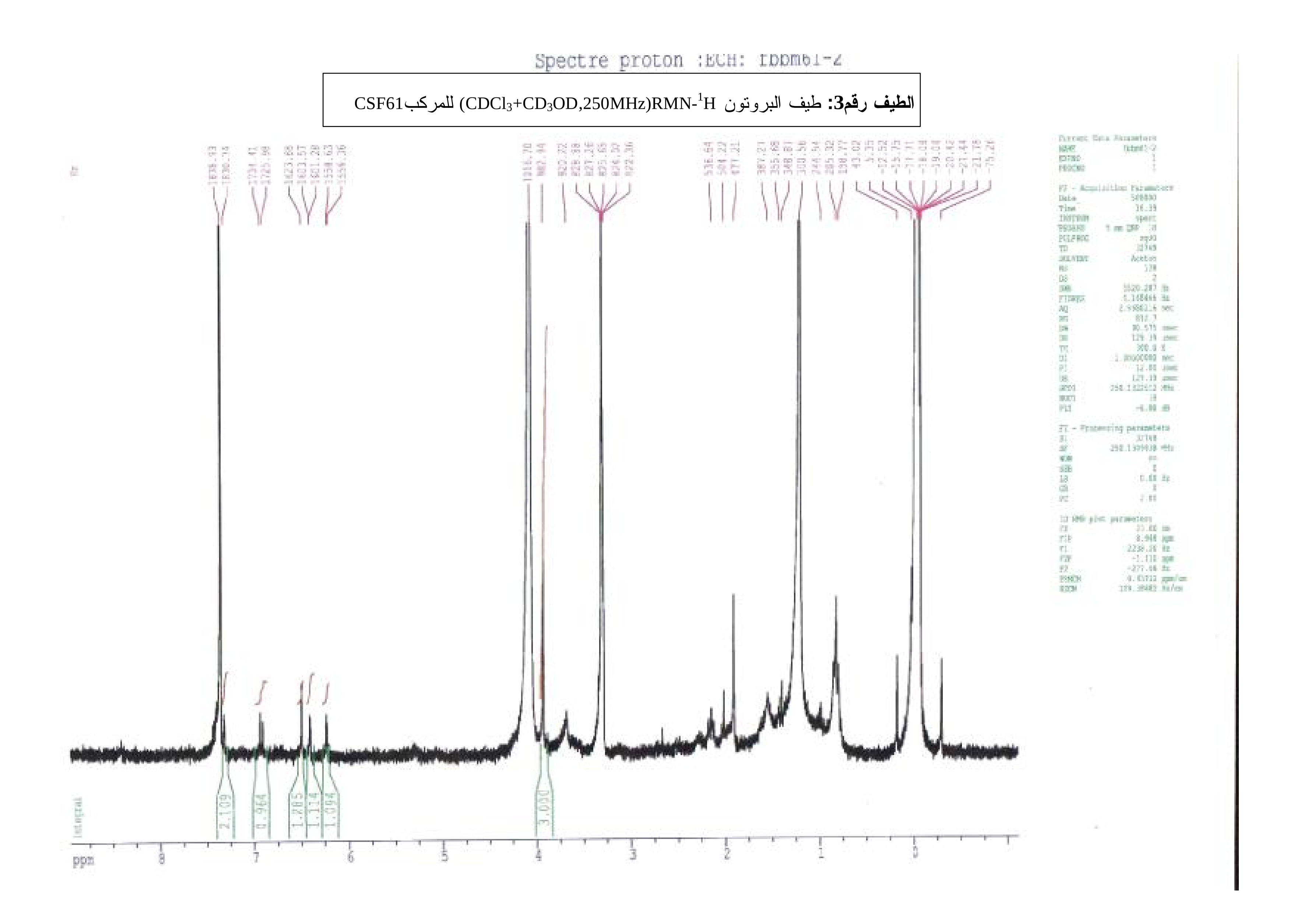
الطيف رقم1:السلسلة الطيفية للأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركبCSF61



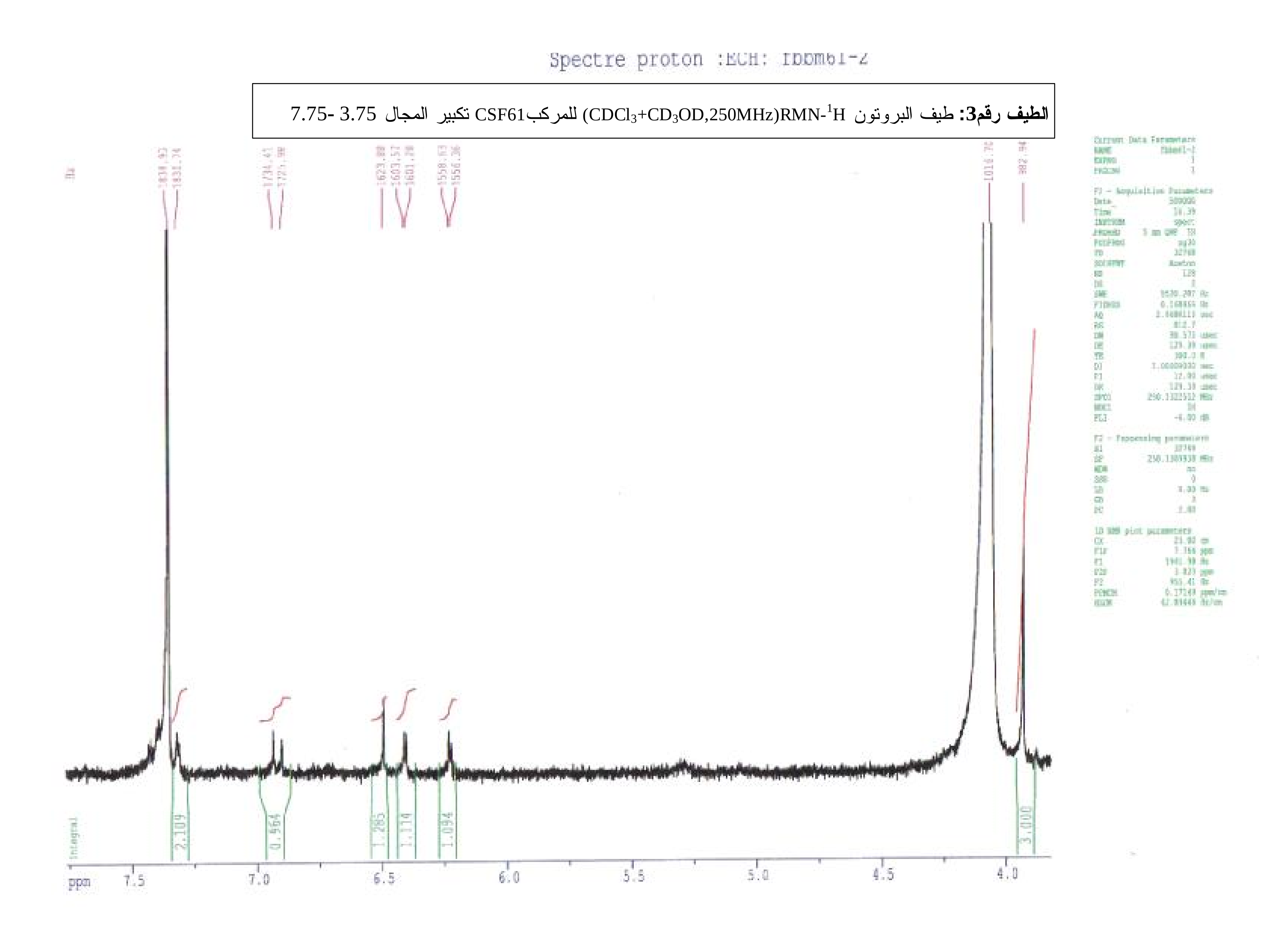
الطيف رقم2: طيف البروتون $RMN\text{-}^{1}H$ $(CD_3COCD_3, 250MHz)$ للمركب CSF61



الطيف رقم2: طيف البروتون $RMN\text{-}^1H$ $(CD_3COCD_3, 250MHz)$ للمركب CSF61 تكبير المجال 3.50-7.75



الطيف رقم3: طيف البروتون RMN-^{1}H ($CDCl_3$+CD_3OD,250MHz) للمركب CSF61



الطيف رقم3: طيف البروتون RMN-^{1}H $(CDCl_3+CD_3OD,250MHz)$ للمركب CSF61 تكبير المجال 3.75 -7.75

2.IV. تشخيص المركب CSF_{62} :

خواصه الكروماتوغرافية:

جدول رقم13 : الخواص الكروماتوغرافية للمركب CSF_{62}

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.73	0.02
اللون الإستشعاعي	بنفسجي	

الجدول رقم14 : نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV)
للمركب CSF_{62} (الطيف رقم4: طول الموجة بالنانومتر)

المفاعلات	الحزمة II	الحزمة I
MeOH	268	332
NaOH	324-276	392
NaOAc	272	344
H_3BO_3 + NaOAc	272	348
$AlCl_3$	276	384-348
$AlCl_3$+HCl	276	384-348

التحليل:

اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) و الحزمةI في حدود 332 نم بالنسبة للطيف المسجل في MeOH دلالة على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الوضع3

قيم ثابت الاحتباس(R_f) تدل على أن المركب هو اجليكون .

بمقارنة الطيف المسجل في NaOH بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باثوكرومية للحزمةI (+60 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع4'.
نلاحظ ظهور حزمة جديدة في حدود 324 نم دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع7.

بمقارنة الطيف المسجل في $AlCl_3$ بالطيف المسجل في ($AlCl_3$+HCl) لا نجد أي إزاحة دلالة على عدم وجود أي أورثو ثنائي هيدروكسيل.

بمقارنة الطيف المسجل في($AlCl_3$+HCl) بالطيف المسجل فيMeOH نجد إزاحة باثوكرومية للحزمةI (+52 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع5.

الطيف المسجل في NaOAc يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الوضع7 و هذا اعتمادا على الإزاحة الباثوكرومية للحزمةII (+4 نم) و التي تشير أيضا إلى عدم وجود مستبدل في الوضع6 و الوضع8 و بما أن الطيف لا يتحلل مع الوقت فإنه لا وجود لثلاثي هيدروكسيل و لا وجود لأورتو ثنائي الهيدروكسيل أيضا على الحلقة A .

الطيف المسجل في (H_3BO_3 + NaOAc) يشير إلى عدم وجود أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةA و الحلقةB و هي نفس الملاحظات المأخوذة من الطيف المسجل في($AlCl_3$+HCl).

من هذه النتائج يمكن كتابة الصيغة التالية:

الجدول رقم15 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN\text{-}^1H$ **للمركب CSF_{62}** (CD_3COCD_3,250MHz) **(الطيف رقم5)**

التعيينات الكيميائية	ثابت الإقتران J(Hz)	التكامل	التعددية	الإزاحة d(ppm)
H_6	2.1	1H	d	6.28
H_8	2.1	1H	d	6.57
H_3	—	1H	s	6.64
$H_{3'},H_{5'}$	8.91	2H	d	7.06
$H_{2'},H_{6'}$	8.91	2H	d	7.96

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون $RMN\text{-}^1H$ (الطيف رقم5) والذي دونت نتائجه في الجدول رقم15 وجود إشارتين ثنائيتين (J=2.1) بتكامل 1H لكل منهما عند δ=6.28 وδ=6.57 وهي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقةA لذا يمكن نسبتهما إلى كل من H_6 وH_8 على الترتيب وذلك تأكيدا لمعطيات مطيافية الأشعة فوق البنفسجية(UV).

كما يبين نفس الطيف وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند6.64 =δ يمكن نسبتها إلى البروتون H_3 وهذا ما يؤكد ان المركب هو فلافون وليس فلافونول مستبدل في الوضع3.

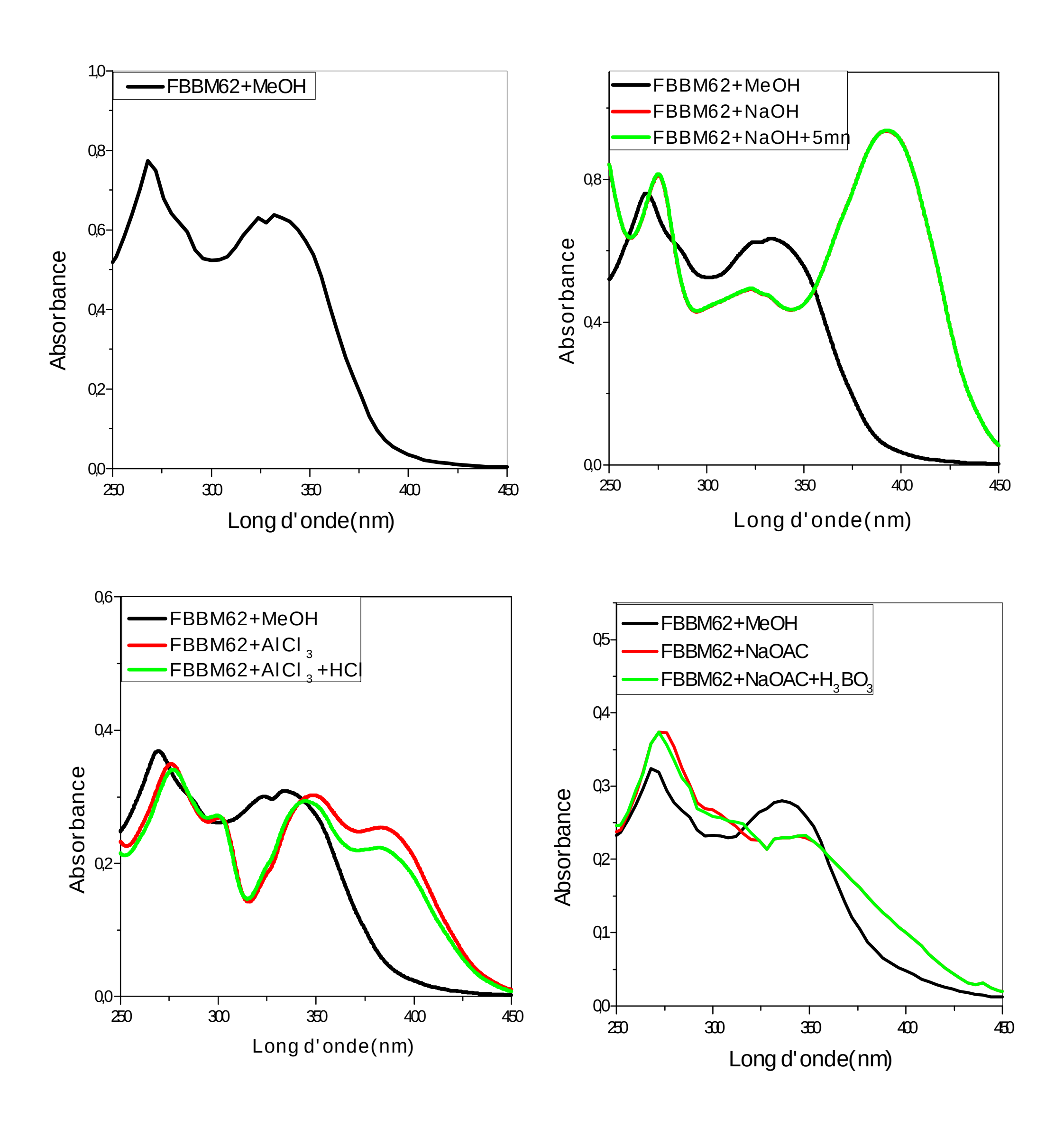
و نشير أيضا إلى وجود إشارتين ثنائيتين بتكامل 2H لكل منهما عند δ=7.06 وδ=7.96 هاتان الإشارتان مميزتان لبروتونات الحلقة B المستبدلة في الموقع'4 ($H_{2'},H_{6'}$. $H_{3'},H_{5'}$)

ملاحظة:

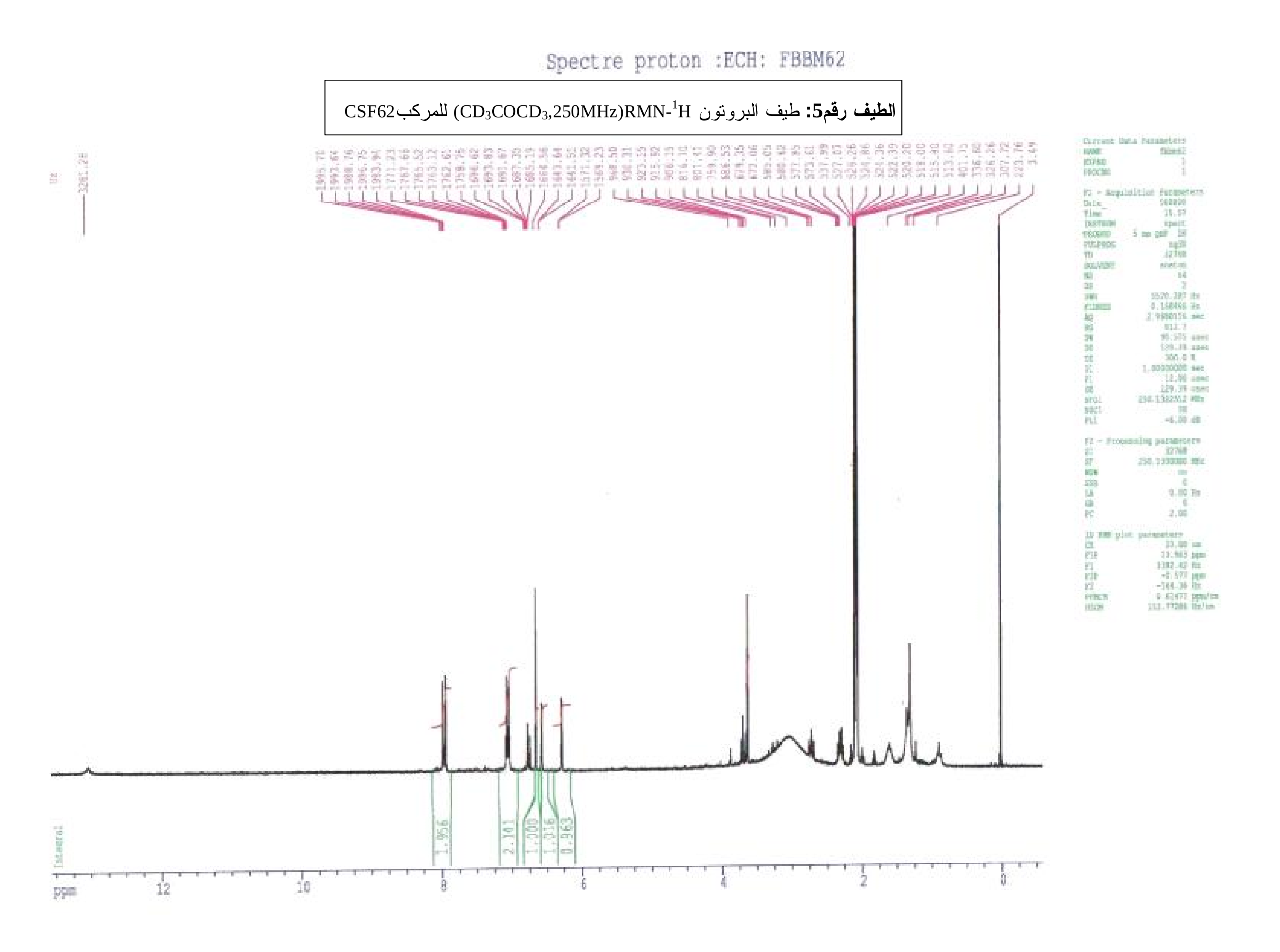
الاشارتان الموجودتان في حدود 6.80 =δ خاصة ببعض الشوائب و هي نفسها الموجودة في الطيف رقم2 الخاص بالمركبCSF_{61} قبل تنقيته، إذ يلاحظ زوال هاتين الاشارتين بعد تنقيته (الطيف رقم3)، وبهذا نتأكد من أنها خاصة ببعض الشوائب.

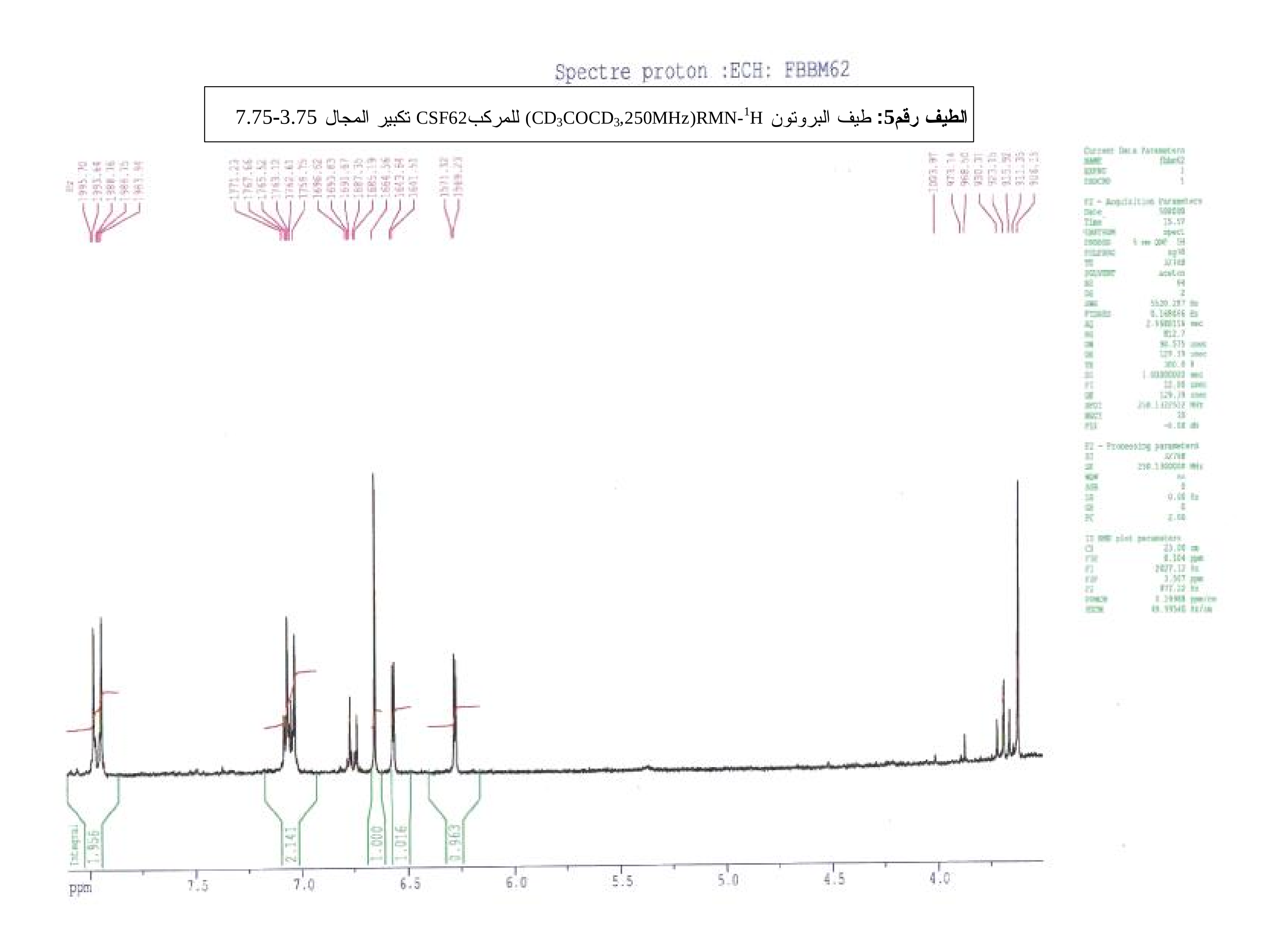
مجموعة هذه المعلومات تقود إلى الصيغة التالية :

5,7,4'-trihydroxy flavone (apigénine).



الطيف رقم4: السلسلة الطيفية للأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CSF62


Spectre proton :ECH: FBBM62
الطيف رقم5: طيف البروتون RMN-¹H (CD₃COCD₃,250MHz) للمركب CSF62
ppm
12
10
8
6
4
2
0
1.956
2.141
1.000
1.016
0.963



الطيف رقم5: طيف البروتون RMN-^{1}H (CD$_3$COCD$_3$,250MHz) للمركب CSF62 تكبير المجال 7.75-3.75

IV.3. تشخيص المركب CSF_{101} :

خواصه الكروماتوغرافية:

جدول رقم16: الخواص الكروماتوغرافية للمركب CSF_{101}

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.65	0.04
اللون الإستشعاعي	بنفسجي	

الجدول رقم17: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV)

للمركب CSF_{101} (الطيف رقم6:طول الموجة بالنانومتر)

المفاعلات	الحزمة II	الحزمة I
MeOH	272	352
NaOH	324-272	404
NaOAc	272	352
H_3BO_3 + NaOAc	264	376
$AlCl_3$	276	424
$AlCl_3$+HCl	280-264	368

التحليل:

اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) و الحزمةI في حدود 352 نم بالنسبة للطيف المسجل في MeOH دلالة على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الوضع3

قيم ثابت الاحتباس(R_f) تدل على أن المركب هو اجليكون .

بمقارنـــة الطيف المسجل في NaOH بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحـــة باثوكروميـــة للحزمةI (+52 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع4'، كما نلاحظ ظهور حزمة جديدة في حدود 324نم دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع7 .

بمقارنة الطيف المسجل في$AlCl_3$ بالطيف المسجل في($AlCl_3$+HCl) نلاحظ وجود إزاحة هيبسوكرومية (-56 نم) دلالة على وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقةA أو الحلقةB.

بمقارنةالطيف المسجل في($AlCl_3$+HCl) بـــالطيف المســـجل فـــيMeOH نجـــد إزاحـــة باثوكروميـــة للحزمةI (+16 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حرفي الوضع5 مع مجموعة أوكسيجينية في الوضع6.

الطيف المسجل في NaOAc يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الوضع7 هذا اعتمادا على عدم وجود أي إزاحة باثوكرومية للحزمة II و التي تشير أيضا إلى وجود مستبدل في الوضع6 أو الوضع8 و بما أن الطيف لا يتحلل مع الوقت فإنه لا وجود لثلاثي هيدروكسيل و لا وجود لأورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A.

الطيف المسجل في (H_3BO_3 + NaOAc) يشير إلى وجود أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB هذا اعتمادا على وجود إزاحة باثوكرومية للحزمةI (+24 نم).

من هذه النتائج يمكن كتابة الصيغة التالية:

الجدول رقم18 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H

للمركب CSF_{101}(الطيف رقم7) (CD_3COCD_3,250MHz)

التعيينات الكيميائية	ثابت الإقتران J(Hz)	التكامل	التعددية	الإزاحة d(ppm)
H_8	—	1H	s	6.61
H_3	—	1H	s	6.63
$H_{5'}$	8.5	1H	d	7.05
$H_{6'}$	8.5- 2.25	1H	dd	7.50
$H_{2'}$	2.25	1H	d	7.53
$-OCH_3$	—	3H	s	3.88

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H (الطيف رقم7) الذي دونت نتائجه في الجدول رقم18 وجود إشارة أحادية بتكامل 1H عند δ=6.61 يمكن نسبتها إلى البروتون H_8 وهذا تأكيدا لمعطيات مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV).

ونجد أيضا إشارة أحادية بتكامل 1H عند δ=6.63 يمكن نسبتها إلى البروتون H_3

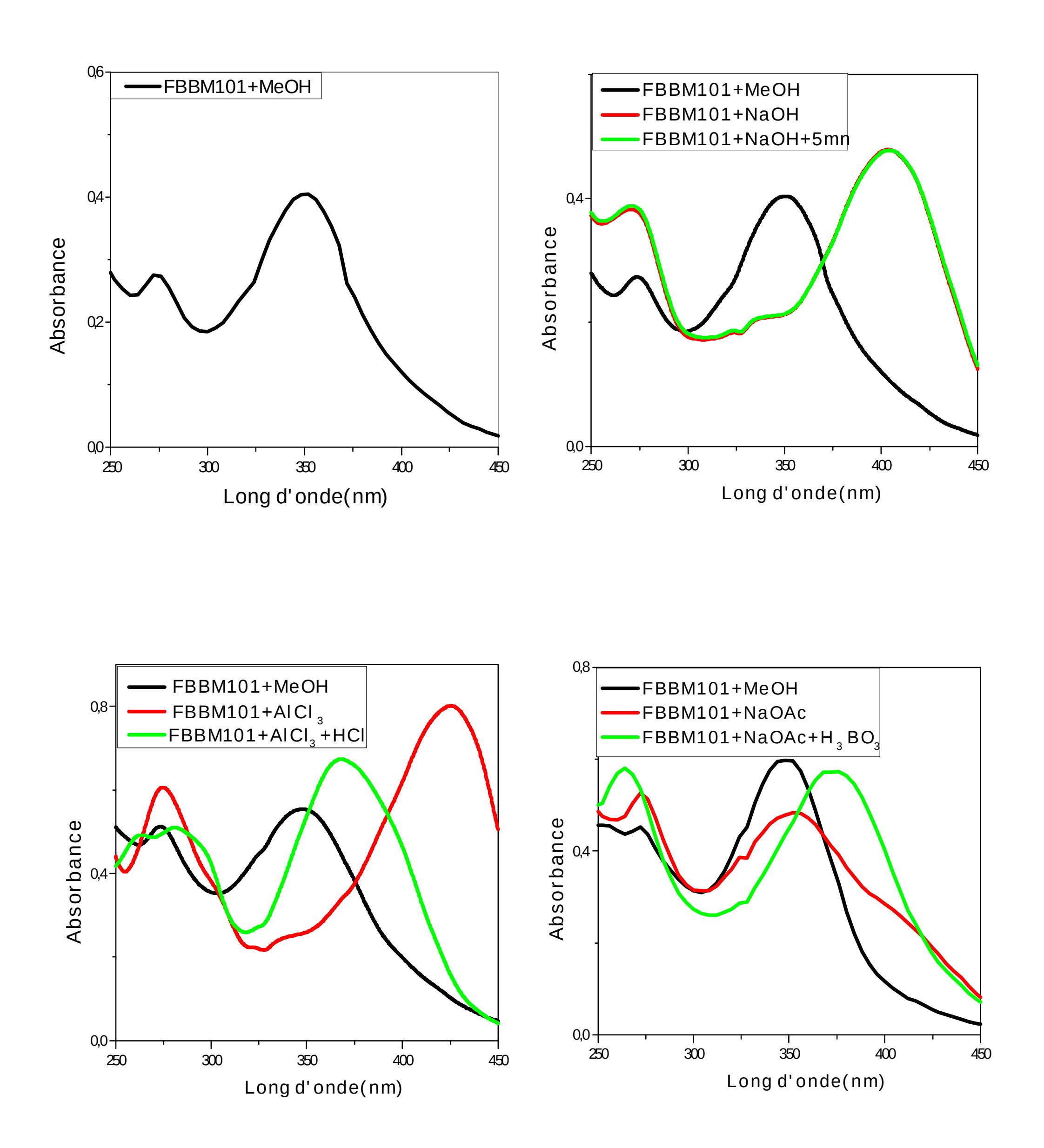
كما يبين نفس الطيف وجود إشارة ثنائية(J=8.50) بتكامل 1H عند δ=7.05 يمكن نسبتها إلى البروتون$H_{5'}$

و نشير أيضا إلى وجود إشارات متداخلة (ثنائي- ثنائي2.25 ، J=8.5 ، ثنائيJ=2.25) بتكامل 2H عند δ=7.50 وδ=7.53 وهي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقةB يمكن نسبتهما إلى كل من البروتونين $H_{2'}$,$H_{6'}$ على الترتيب.

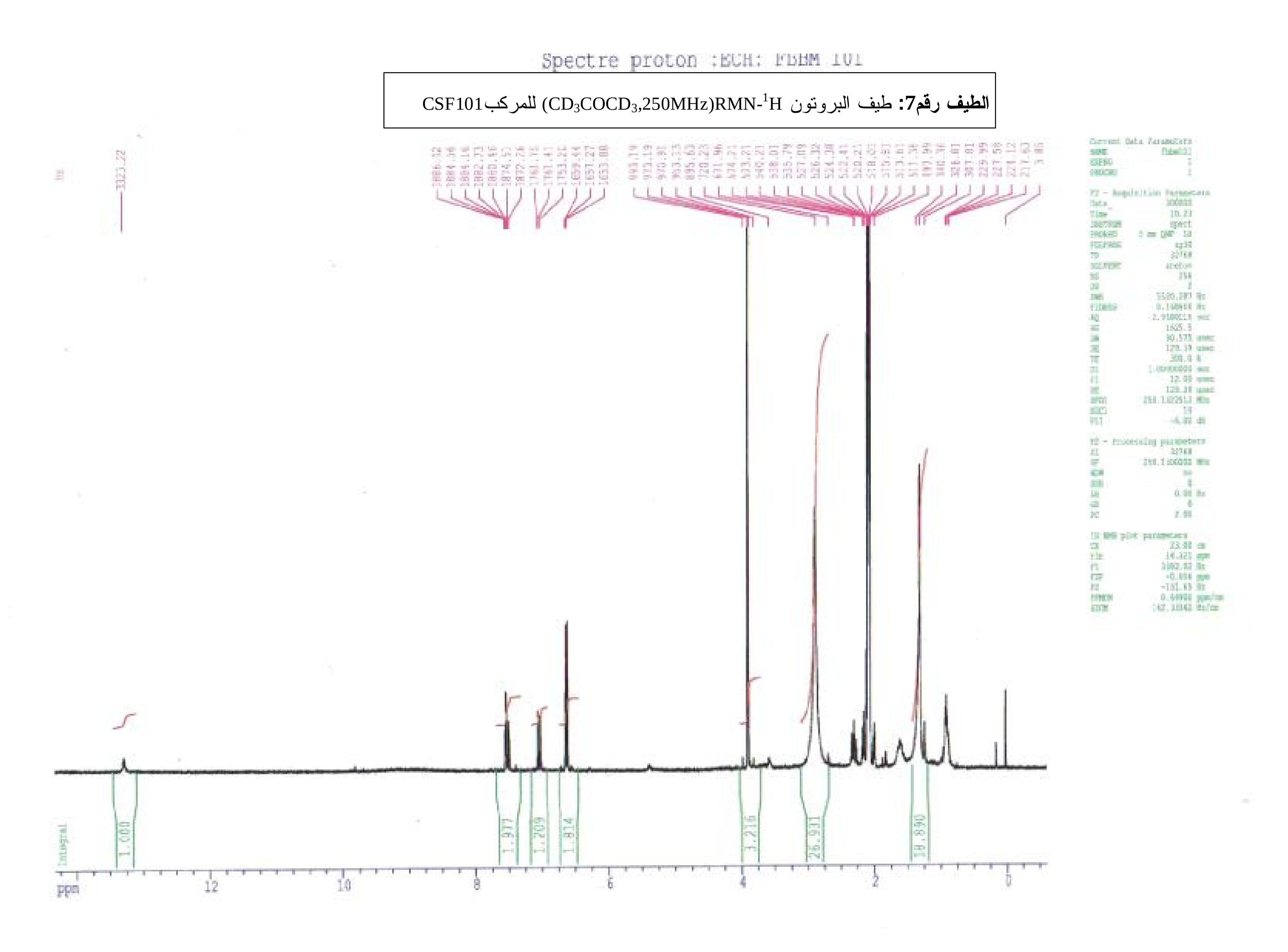
ونلاحظ و جود إشارة أحادية عند δ=3.88 بتكامل3H خاصة بمجموعة ميثوكسيل في الوضع6 وهـذا إعتمادا على النتائج السابقة، و تأكيدا لنتائج المقارنة الخاصة بالطيف المسجل في الميثـانول والطيـف المسجل في($AlCl_3$+HCl).

مجموعة هذه المعلومات تقود إلى الصيغة التالية :

5,7,3',4'-tetrahydroxy 6-methoxyflavone (6-methoxy lutéoline)

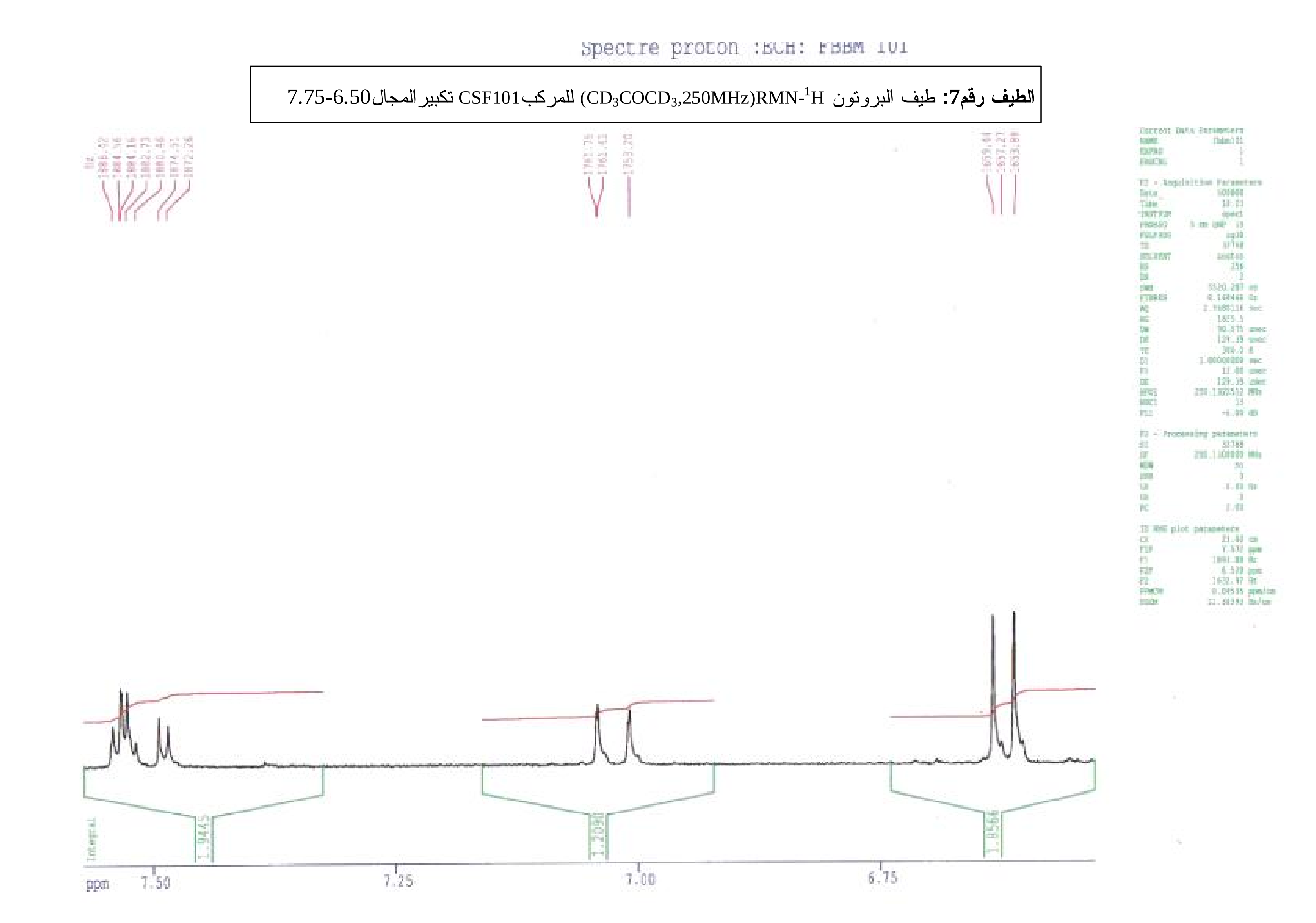


الطيف رقم6: السلسلة الطيفية للأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركبCSF101



الطيف رقم7: طيف البروتون ^{1}H-RMN$(CD_3COCD_3, 250MHz)$ للمركب CSF101

الطيف رقم7: طيف البروتون $RMN-^{1}H$ $(CD_3COCD_3,250MHz)$ للمركب CSF101 تكبير المجال 7.75-6.50



3.IV. تشخيص المركب CSF_{102} :

خواصه الكروماتوغرافية:

جدول رقم19 : الخواص الكروماتوغرافية للمركب CSF_{102}

النظام	I	II
ثابت الإحتباس	0.61	0.06
اللون الإستشعاعي	بنفسجي	

الجدول رقم20: نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV)
للمركب CSF_{102} (الطيف رقم8:طول الموجة بالنانومتر)

المفاعلات	الحزمة II	الحزمة I
MeOH	252	348
NaOH	324-268	404
NaOAc	260	376-368
H_3BO_3 + NaOAc	256	360
$AlCl_3$	272	424
$AlCl_3$+HCl	272	388-384

التحليل:

اللون البنفسجي تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV) و الحزمةI في حدود 348 نم بالنسبة للطيف المسجل في MeOH دلالة على أن المركب فلافون أو فلافونول مستبدل في الوضع3

قيم ثابت الاحتباس(R_f) تدل على أن المركب هو اجليكون.

بمقارنة الطيف المسجل في NaOH بالطيــف المسجل فيMeOH نجد إزاحة باثوكرومية للحزمة I (+56 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع4'، كما نلاحظ ظهور حزمة جديدة فـــي حـــدود 324نم دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع7 .

بمقارنة الطيف المسجل في $AlCl_3$ بالطيف المسجل في $(AlCl_3+HCl)$ نلاحظ وجود إزاحة هيبسوكرومية (-36 نم) دلالة على وجود أورثو ثنائي هيدروكسيل على الحلقةB أو الحلقةA .

بمقارنة الطيف المسجل في$(AlCl_3+HCl)$ بالطيف المسجل في MeOH نجد إزاحة باثوكرومية للحزمةI (+40 نم) دلالة على وجود هيدروكسيل حر في الوضع5 .

الطيف المسجل في NaOAc يؤكد وجود هيدروكسيل حر في الوضع7 هذا اعتمادا على وجود إزاحة باثوكرومية للحزمةII (+8 نم) و التي تشير أيضا إلى عدم وجود مستبدل في الوضع6 أو الوضع8 و بما أن الطيف لا يتحلل مع الوقت فإنه لا وجود لثلاثي هيدروكسيل ولا وجود لأورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقة A.

الطيف المسجل في $(H_3BO_3 + NaOAc)$ يشير إلى وجود أورتو ثنائي الهيدروكسيل على الحلقةB هذا اعتمادا على وجود إزاحة باثوكرومية للحزمةI (+12 نم).

من هذه النتائج يمكن كتابة الصيغة التالية:

الجدول رقم21 : نتائج طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H

للمركب CSF_{102}(CD_3COCD_3,250MHz)**(الطيف رقم9)**

الإزاحة d(ppm)	**التعددية**	**التكامل**	**ثابت الإقتران J(Hz)**	**التعيينات الكيميائية**
6.27	d	1H	2.15	H_6
6.54	d	1H	2.15	H_8
6.61	s	1H		H_3
7.02	d	1H	8.15	$H_{5'}$
7.49	dd	1H	8.15- 2.15	$H_{6'}$
7.52	d	1H	2.15	$H_{2'}$

يبين طيف الرنين النووي المغناطيسي للبروتون RMN-^{1}H (الطيف رقم9) الذي دونت نتائجه في الجدول رقم21 وجود إشارتين ثنائيتين (J=2.15) بتكامل 1H لكل منهما عند δ=6.54 وδ=6.27 وهي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقةA لذا يمكن نسبتهما إلى كل من البروتونين H_8 وH_6 على الترتيب وذلك تأكيدا لما ورد في نتائج مطيافية الأشعة فوق البنفسجية (UV) .

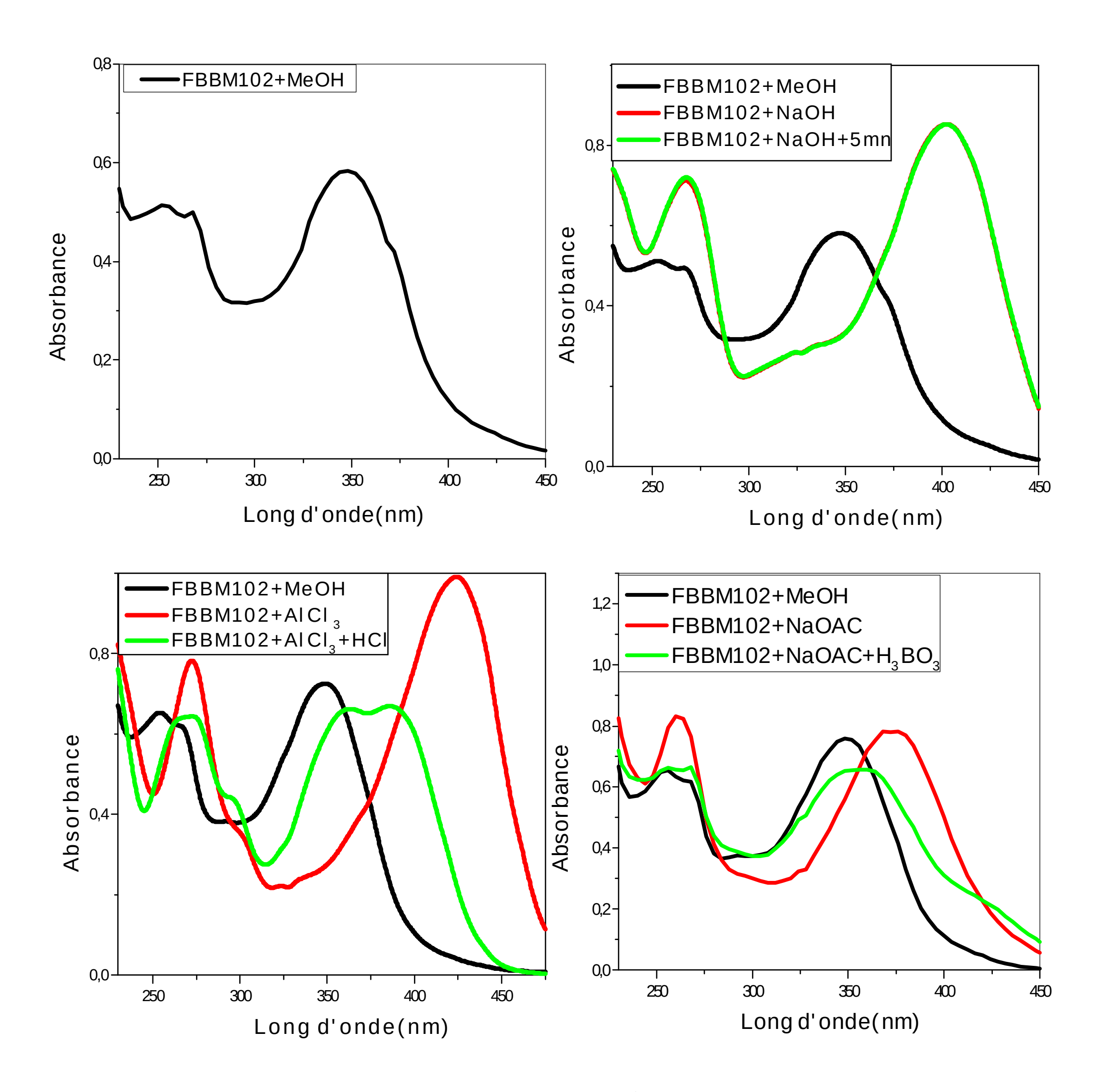
كما يبين نفس الطيف وجود إشارة أحادية عندδ=6.61 خاصة بالبروتونH_3 (فلافون).

و نشير أيضا إلى وجود إشارة ثنائية(J=8.15) بتكامل 1H عند δ=7.02 يمكن نسبتها إلى البروتونH_5.

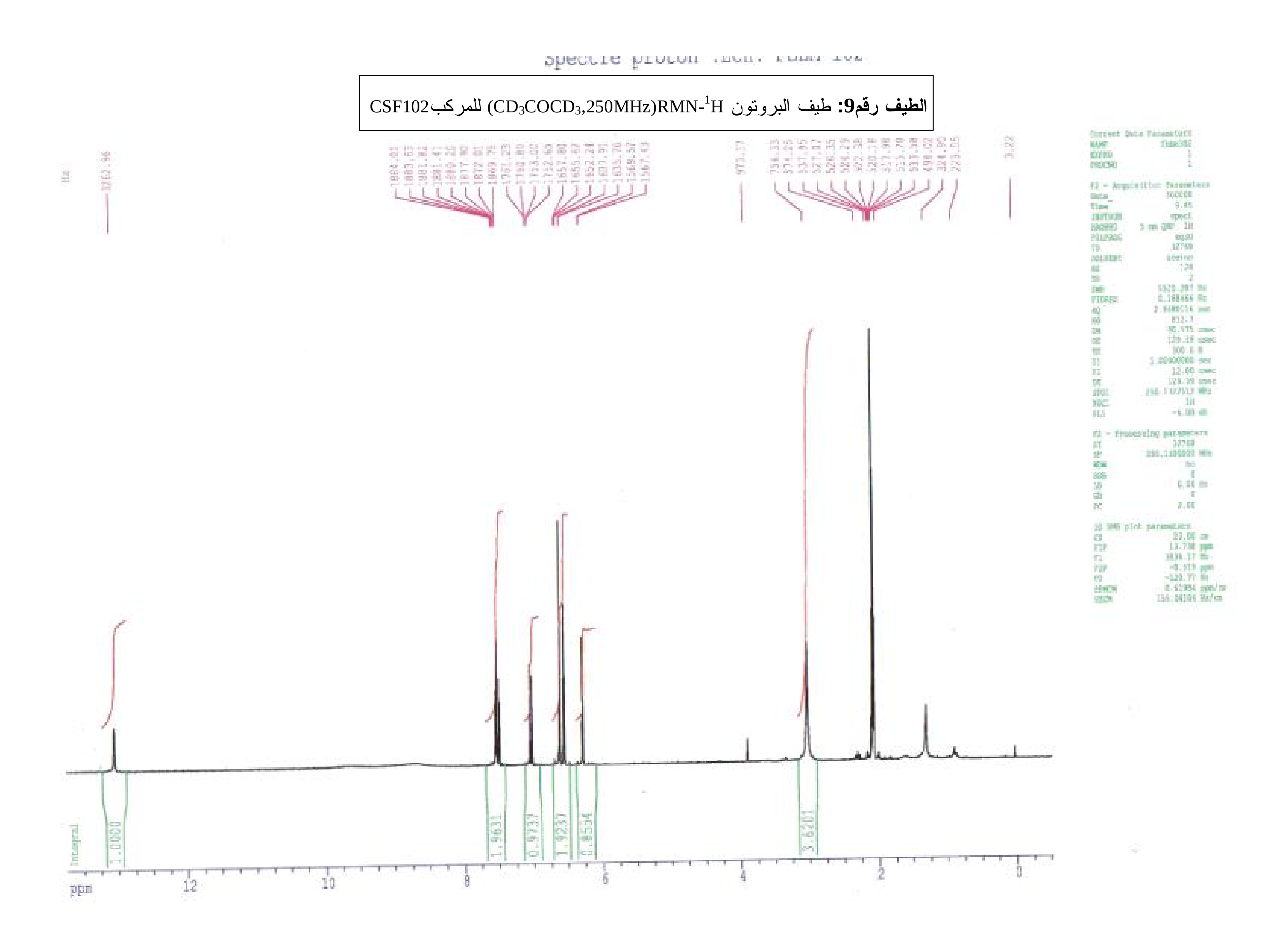
و يمكن ملاحظة وجود إشارات متداخلة (ثنائي - ثنائيJ=8.15،2.15، ثنائيJ=2.15) بتكامل 2H عند δ=7.49 وδ=7.52 وهي إزاحات خاصة ببروتونات الحلقةB لذا يمكن نسبتهما إلى كل من البروتونين $H_{2'}$,$H_{6'}$ عند على الترتيب.

مجموعة هذه المعلومات تقود إلى الصيغة التالية :

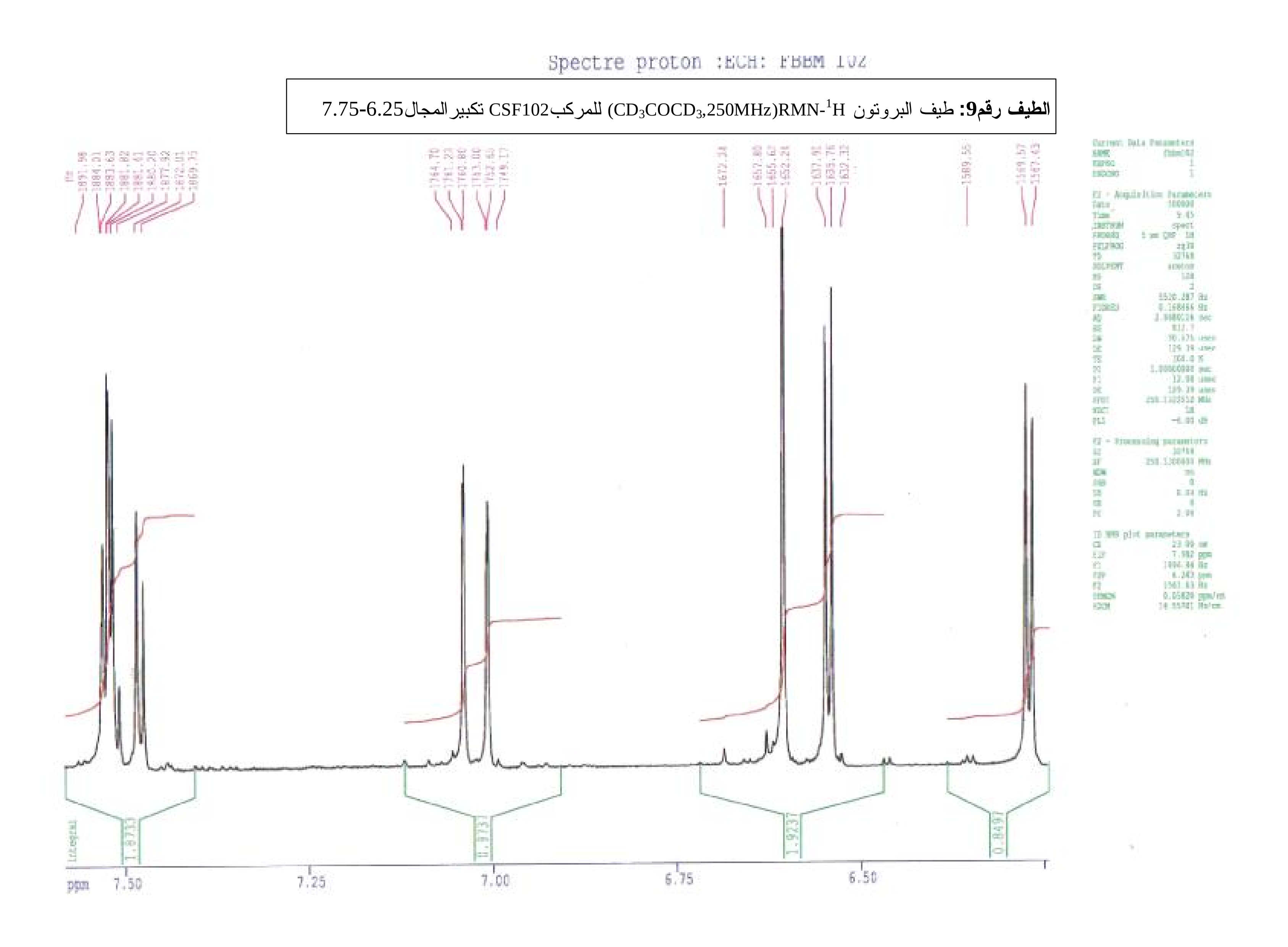
5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (lutéoline)



الطيف رقم8:السلسلة الطيفية للأشعة فوق البنفسجية (UV) للمركب CSF102



الطيف رقم9: طيف البروتون $RMN-^1H$ $(CD_3COCD_3, 250MHz)$ للمركب CSF102



الطيف رقم9: طيف البروتون $RMN\text{-}^1H$ $(CD_3COCD_3, 250MHz)$ للمركب CSF102 تكبير المجال 6.25-7.75

الخاتمة:

كما تقدم و أشرنا في بداية هذا البحث فالغاية الرئيسية هي التعرف على نواتج الأيض الثانوي الفلافونويدي لنبات ***Centaurea sphaerocephala* L.**

تمت البداية بعرض مختلف الهياكل الفلافوفويدية، الإصطناع الحيوي، طرق الفصل، التنقية و الاساليب الفيزيوكيميائية لتحديد الصيغة البنيوية.

تمكنا في هذا العمل المخبري من عزل و تحديد الصيغة البنيوية لأربعة مركبات هي:

5,7,4'-trihydroxy 3'-methoxyflavone (3'-methoxy apigénine).

5,7,4'-trihydroxy flavone (apigénine).

5,7,3',4'-tetrahydroxy 6-methoxyflavone (6-methoxy lutéoline)

5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (lutéoline).

إعتمدنا في فصل هذه المركبات على الكروماتوغرافيا بأنواعها (كروماتوغرافيا العمود وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة). و تمت التنقية بالكروماتوغرافيا المتكررة.

إن تحديد الصيغ البنيوية للمركبات المعزولة تم بالإعتماد على التحليل الطيفي للرنين النووي المغناطيسي(RMN-^{1}H) و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية(UV-VIS).

BIBLIOGRAPHIE

المراجع

[1] M. J. Boland et E. Wong, Aur. J. Biochem, 50, 383 (1975),
Biorg. Chem, 8,1 (1979).
[2] G. Kochs et H. Grisebach, Aur. J. Biochem, 155-311 (1986).
[3] G. Stotz, R. Spribille et G. Forkmann, J. Plant Physiol, 116-173 (1984)
[4] L. P. Christensen and L. Jorgen, Phytochemistry, 30, 2663-65 (1991).
[5] N. Mezache, thèse de magister, Constantine (2002).
[6] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, N. Khalfallah
and P. Aclinou, Guaianolide from *Centaurea musimomum*, Phytochemestry,
45 (7), 1449 (1997).
[7] J. G. Platas, C. Ruiz-perez, A. G. Ganzlez, J. Bermejo and K. Medjroubi,
4β,15-dihydro-3dehydrosolstitialin A, Acta Cryst, 55, 1837 (1999).
[8] A. Bentamen, thèse de magister, Constantine (1997).
[9] S. Akkal, F. Benayache, S. Benayache, K. Medjroubi, E. Seguin and F. Telliquin,
Flavonoid Aglycone from *Centaurea napifolia*, Chemistry of natural compounds,
39 (2) 219-220 (2003).
[10] S. Akkal, S. Benayache, S. Benayache and M. Jay, Flavonoids from
Centaurea incana, Biochemical systematic and Ecology, 4, 361 (1997).
[11] R. Bencherait, thèse de magister, Constantine (1989).
[12] K. Medjroubi, thèse de magister, Constantine (1991).
[13] F. Benayache, S. Benayache, K. Medjroubi, G. Massiot, P. Aclinou, B. Drodz
and G. Nowak, Phytochemestry, 31 (12), 4359-4360 (1992).
[14] G. Athmani, S. Benayache, F. Benayache, H. dendoughi, M. Jay, J. Sac.
Alger. Chem, 8 (1), 29-36 (1998).
[15] K. Medjroubi, N. Bouderdara, F. Benayache, S. Akkal, E. Seguin and F. Telliquin,
Sesquiterpene lactone of *Centaurea nicaensis*, Chemistry
of natural compounds, 39 (5), 506 (2003).
[16] S. Akkal, F. Benayache, S. Benayache, K. Medjroubi, M. Jay, F. Telliquin and
E. Seguin, New flavone glycoside from, *Centaurea furfuracea*,
Fitoterapia, 70, 368-370 (1999).
[17] S. Delouche, thèse de magister, Constantine (2003).
[18] C. Boubekri, thèse de magister, Constantine (2003).
[19] R. Benakcha, thèse de magister, Constantine (2001).

[20] K. Medjroubi, F. Benayache, S. Benayache, S. Akkal, M. Kaabeche, E. Seguin and F. Telliquin, Eudesmanolide from *Centaurea granata*, Phytochemestry, 49 (8), 2425 (1998).
[21] A. Bentamen, thèse de doctorat, Constantine (2005).
[22] T. Mishio, T. Honma and T. Iwashina, Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments**,** Biochemical Systematics and Ecology, V. 34, 180-184(2006)
[23] S. Çelik, S. Rosselli, A. M. Maggio, R. A. Raccuglia, I. Uysal, W. Kisiel, K. Michalska and M. Bruno, Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*, Biochemical Systematics and Ecology, V. 34, 349-352 (2006)
[24] M. Shoeb, S.M. MacManus, Y. Kumarasamy, M. Jaspars, L. Nahar, P. Kong Thoo-Lin, H. Nazemiyeh and S. D. Sarker Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana* Phytochemistry, In Press, Corrected Proof, (2006).
[25] K. Rämö, H. Slotte, T. Kanerva, K. Ojanperä and S. Manninen, Growth and visible injuries of four *C. jacea* L. ecotypes exposed to elevated ozone and carbon dioxide, Environmental and Experimental Botany, V. 58, Issues 1-3, 287-298 (2006).
[26] M. M. S. M.Bastos, A. Kijjoa, J. M. Cardoso, A. B.Gutierrez and W. Herz, Planta Med, 56, 403-405 (1990).
[27] M. Bruno, C. Fazio, S. Passananti, M. P. Paternostro, J. G. Diaz and W. Herz, Phytochemistry, 35(5), 1371-1372 (1994).
[28] E. Haslam, in comprehensive organic chemistry, eds D. H. R. Barton and W. D. ollis, pergamon, oxford, 5, 1167-205 (1979).
[29] F. Gibson and J. Pittard, Bact, Rev, 32, 465-92 (1968).
[30] L. Crombie, I. Holden, N. Van Brggen and whiting, A. chem. Soc, 1063-5 (1986).
[31] J. B. Harbone, Flavonoids-in phytochemistry- eds J. B. Litton, educational publishing inc (1973).
[32] P. R. Gayon, Les composés phénoliques des végétaux, eds Dunod, Paris (1968).
[33] J. Mann, Secondary metabolism, eds Clarendon press, Oxford (1987).
[34] H. Edwin, Shikimic acid, metabolism and metabolites, eds john Wiley and Sons (1993).
[35] J. B. Harborne, The flavonoids, advances in research since 1980, eds Chapman and Hall, New York (1988).
[36] J. Chopin, Actualités de phytochimie fondamentale, 2eme Série, eds Masson, Paris, 119 (1966).
[37] J. B. Harborne, The flavonoids, V. 2, eds Chapman and Hall, London (1975).
[38] L. Ptschke, and H. Y. Grisebach, Natur forsch, 20b, 1039-42 (1965).
[39] H. Grisebach, and W. Barz. Naturwiss, 56, 538-44 (1969).
[40] J. B. Harborne, Biochemistry of phenolis compounds Academic press, New York (1964).

[41] G. Richter, Metabolism des végétaux, physiologie et biochimie, eds press polytechniques et Universitaire Romandes, Lausanne (1993).
[42] J. J. Lee, A.sano, Y. Sheih, T. L. etal.J. Amer. chem. Soc, 106. 3367-8 (1984).
[43] M. J. Turner, B. W. smith, and E. J. Haslam, chem. Soc. perkinI, 52. 5 (1975).
[44] V. Deluca, R. K. Ibrahim, Arch biochem biophs, 606 (1985).
[45] J. B. Harborne and T. Swain, perspectives in phytochemistry, Academic press, London (1969).
[46] M. Z. Jay, Natur forsch, 38c, 413 (1983).
[47] Z. Sutfeld, Natur forsch, 36c, 30 (1981).
[48] J. L. Massot, M. N. Bertran et T. Adzet, Plantes Med et Phytotherapie, 8 (1), 41-45 (1979).
[49] L. Beranger-Beausquesne, M. Pinlkas, M. Torck, Les plantes dans la therapeutique moderne. Ed. Maaloine (1975).
[50] G. E. Ferraro, Acta frm. Bonaerense, 2 (2), 97-103 (1983).
[51] P. G. Pietta, J. Nat. prod, 63, 1035-1042 (2000).
[52] D. Puiseux, D. S., Plantamedica, 2,95-190 (1988).
[53] J. W. Melure, Physiologie and function of flavonoids, eds Chapman and Hall, London (1975).
[54] D. Jiang, D. H. Zien, W. J. Ren, Phytochemistry, 62 (8), 1235-1238 (2003)
[55] C. M. O. Simoes, M. Amoros, Grre, L., J. Nat. pro, 53, 989 (1990).
[56] J. Bruneton, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, eds techniques et documentation, 2eme édition Lavoisier (1993).
[57] K. Kamanzi et J. Raynaud, Plantes Med et Phytotherapie, 10, 78-84 (1976).
[58] B. Drodz, Diss. Pharm. Pharmacol. 19, 223-225 (1967).
[59] B. Maurizio and H. Warner, Phytochemistry, 27 (6), 1873-75 (1988).
[60] S. C. Chu, Y. S. Hsich, J. Y. Lin, J. Nat. pro, 55, 179 (1992).
[61] M. Paris et M. Hurabielle, Abrege de matiere medicale.V.I eds Masson, Paris, New York (1981).
[62] M. Ghbor, Anti-inflammatory and antiallargic properties of flavonoids in cody, V. 5, eds plant flavonoids in biology and medicine, New York (1986).
[63] M. T. Pischen, E. Seoane, A. Tortajada, Phytochemistry, 23, 9 (1984).
[64] J. V. Arnold, A.Roger, Advances in medicinal plant research, eds Wissenchft liche verlgs gesellschaft mbh, Stuttgart (1985).
[65] H. K. Wang, S. Y. Lin, K. M. Hwang, G. Tylor and K. M. Lee, Bioorg, Med. chem, 2, 1397 (1994).
[66] Randerathk, Chromatographie sur couches minces, eds Gautier Villard (1971).
[67] J. B. Harborne, The flavonoids, V .1, eds Chapman and Hall, London (1975).
[68] K. R. Markham, Methods in plant biochemistry, eds academic press voll, 197-232 (1989).
[69] Alain berhillier, La chromatographie et ses application-dundo (1972)
[70] T. J. Mabry, M. B. Thomas, The systematic identification of flavonoids, eds Springer-Verlag, Berlin (1970).

[71] L. Jurd and Horowttz, The chemistry of flavonoid compounds.
pergmon press New York, 107-155 (1962).
[72] T. J. Marbry, Perspectives in phytochemistry, p. 45,
eds Chapman and Hall. London (1969).
[73] T. J. Marbry, Perspectives in phytochemistry,
eds, J. B. Harborne. Academic press (1963).
[74] K. R. Markham, The technique of flavonoids identification,
eds academic press, London, New York (1982).
[75] K. R. Markham, and H. Geiger, $^{1-}$H NMR Spectroscopy of flavonoids,
eds J. B. Harborne. Chapman and Hall, London (1993).
[76] T.Y. Marbry, The ultra-violet and nuclear magnetic resonance analysis of
flavonoids in respective in phytochemistry, eds J. B. Harborne, 1-45 (1969).
[77] M. Becchi, D. Fraisse, Fast atom bombardment and Collision Activated-
dissociation|mass-analysis ion Kin tics analysis of C-Glycosidic flavonoids.
Biomedical and environmental mass electrometry, 18, 122-130 (1989).

الملخص:

إنصب إهتمامنا في هذا البحث على فصل و تحديد نواتج الأيض الثانوي الفلافونويدي، و قد تمت هذه الدراسة لإعتبارين:

أولهما يتعلق بجنس ***Centaurea*** الذي يكثر إستعماله في الطب الشعبي و لفعاليته ضد كثير من الأمراض.
ثانيهما فيتعلق بالنوع ***sphaerocephala*** الذي لم تتم دراسة نواتج أيضه الثانوي الفلافونويدي سابقا.

و قد توصلنا خلال هذا العمل إلى تحديد أربع صيغ بنيوية لأربعة مركبات فلافونويدية أجليكونية فـــي حالتها الطبيعية.

و المركبات المعزولة هي:

5,7,4'-trihydroxy 3'-methoxyflavone

5,7,4'-trihydroxy flavone

5,7,3',4'-tetrahydroxy 6-methoxyflavone

5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone

إن تحديد الصيغ البنيوية للمركبات المعزولة تم بالإعتماد على التحليل الطيفي للرنين النووي المغنطيسي ($RMN\text{-}^1H$) و مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية(UV-VIS).

Summary

In this research, we attract your attention to the structurisation and the determination of the secondary metabolits notably the type flavonoids.

This investigation was carried by two pathways:

- This first one concerned the genus ***Centaurea*** from which several species are used in folk medicine.

- Secondry it concerns the specie ***sphaerocephala*** which flavonoid secondary metabolism was not studied.

Our experiences on the spicy of genus ***Centaurea sphaerocephala* L.** led to the structural purification and determination of four flavonoids

The separated products are:

5,7,4'-trihydroxy 3'-methoxyflavone (3'methoxy apigenin).

5,7,4'-trihydroxy flavone (apigenin).

5,7,3',4'-tetrahydroxy 6-methoxyflavone (6-methoxy luteolin).

5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (luteolin).

These structuctures were illustrated by the technics:NMR-^{1}H and UV-VIS.

Résumé

Dans cette recherche, nous avons porté notre attention sur la structuration et la détermination des métabolites secondaires notamment de type flavonoïdes.

Cette étude a été menée selon deux approches :

La première concerne le genre ***Centaurea*** dont plusieurs espèces sont utilisées en médecine populaire .

La deuxième concerne l'espèce ***sphaerocephala*** dont l'étude des metabolites secondaires notament de type flavonoïdes n'a pas été réalisée auparavant .

Nos expériences, sur l'espèce de ce genre ***centaurea sphaerocephala*** **L.**, ont abouti á la purification et á la détermination structurales de quatre flavonoïdes.

Les produits séparées sont:

5,7,4'-trihydroxy 3'-methoxyflavone (3'-methoxy apigénine).

5,7,4'-trihydroxy flavone (apigénine).

5,7,3',4'-tetrahydroxy 6-methoxyflavone (6-methoxy lutéoline)

5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone (lutéoline).

Les structures ont été élucidées par les techniques: RMN-^{1}H et UV-VIS.